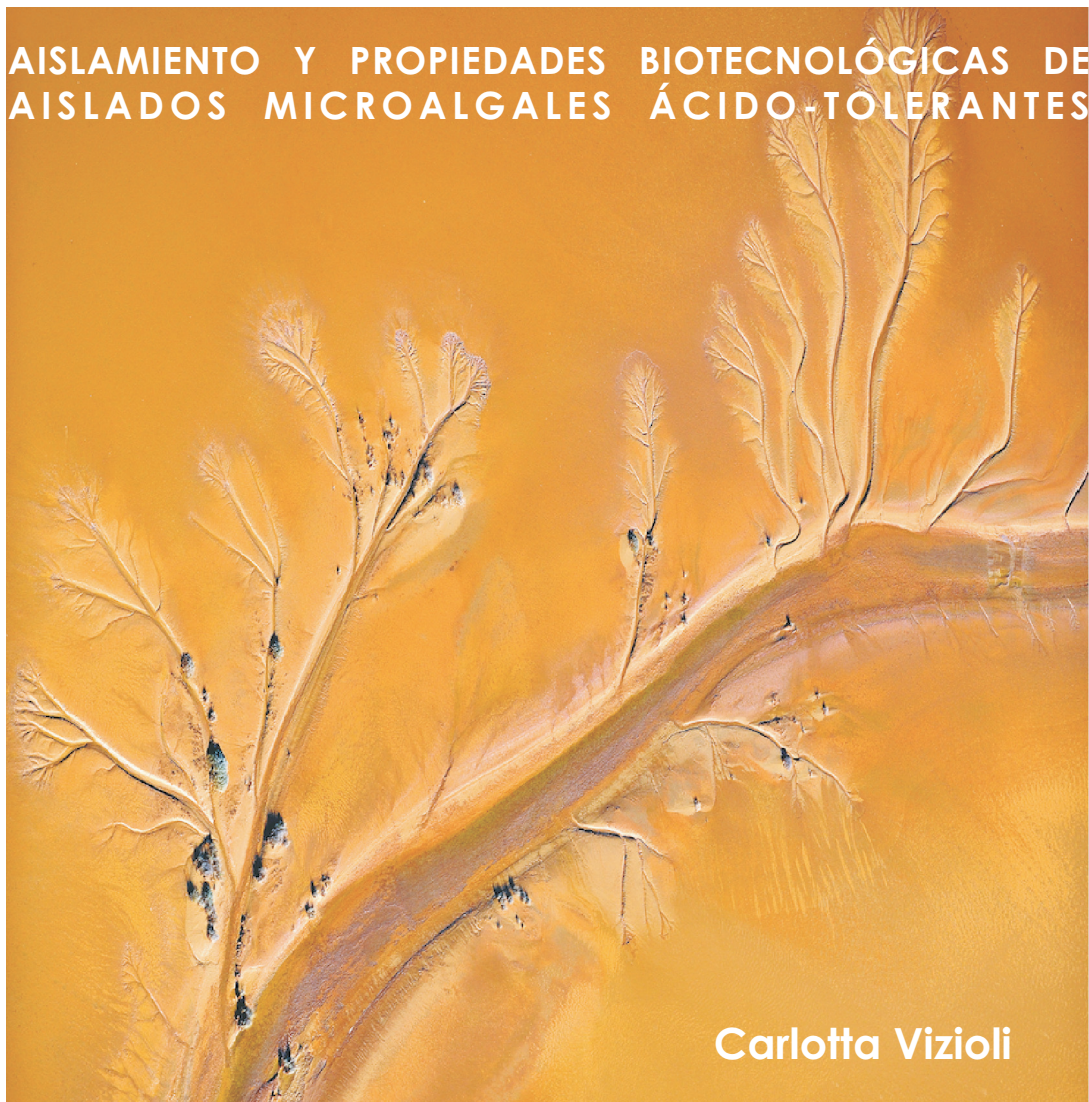


**DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LA ZONA
INTERMAREAL DEL ESTUARIO DEL RIO TINTO.**

**AISLAMIENTO Y PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE
AISLADOS MICROALGALES ÁCIDO-TOLERANTES**



Carlotta Vizioli

**universidad autónoma de madrid
departamento de biología molecular**



facultad de ciencias

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

Programa de doctorado en Microbiología

**DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LA ZONA INTERMAREAL DEL ESTUARIO DEL
RÍO TINTO. AISLAMIENTO Y PROPIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE AISLADOS
MICROALGALES ÁCIDO-TOLERANTES**

Carlotta Vizioli

DIRECTORES

Irma Marín Palma
Profesora titular de Microbiología
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
UAM

Ricardo Amils Pibernat
Catedrático de Microbiología
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
UAM

15 Septiembre 2017

Alla mia famiglia libera

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado por primera vez la zona de influencia mareal en el ecosistema ácido del Río Tinto (Huelva). San Juan del Puerto es la zona del río más lejana de la desembocadura cuyas características ambientales y geo-químicas varían dos veces al día de acuerdo al ciclo mareal. Se ha analizado la diversidad de la comunidad bacteriana a lo largo de las cuatro estaciones del año con diferencia mareal máxima y mínima y se ha comparado con la zona de La Rábida que se encuentra en la desembocadura del río. Los estudios de biodiversidad muestran la existencia de microorganismos acidófilos en las muestras de marea baja pertenecientes a los géneros *Acidocella*, *Acidobacterium*, *Acidiphilium* y *Ferromicrobium*, algunos de ellos identificados también en muestras de marea alta. Se han detectado en muestras de baja marea clones de la bacteria desnitrificante oxidadora de hierro del género *Acidovorax* que no se ha sido localizada en estudios previos en la columna de agua del río. También se han encontrado clones de origen oceánico en las muestras de baja marea pertenecientes a los géneros: *Arcobacter*, *Methylophaga*, *Mesorhizobium*, *Marinobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*. Así mismo no se han detectado, en las muestras de marea baja clones de los géneros *Marinomonas*, *Limnobacter* y *Rhodobacter*. Se realizó un análisis de correspondencia sin tendencia (DCA) integrando los datos de las variables ambientales medidas y analizadas y los resultados del estudio de la diversidad biológica: este trabajo mostró una estrecha correlación entre los microorganismos acidófilos, las muestras de baja marea que los contienen y la presencia de metales pesados. Las muestras de marea alta a pesar de ser más dispersas mostraron un elevado grado de correlación entre propiedades ambientales tales como conductividad, salinidad y pH y la concentración de cloro, lo que indica su clara influencia oceánica.

De los muestreos en San Juan del Puerto en marea alta y marea baja en las estaciones de invierno y primavera y en el de marea baja en otoño, se obtuvieron seis aislados microalgales denominados¹ como: SJP_EBP_1, SJP_EAP_2, SJP_EBO_3, SJP_EBO_4, SJP_EBI_5 que se cultivaron en medio BG11 a pH7 y a pH4 y el cultivo SJP_EAI_6 en medio L1 a pH7. Se caracterizaron filogenéticamente utilizando para ello la secuenciación y análisis del gen 18S rRNA y se adscribieron respectivamente a los taxones: *Parachlorella* sp., *Trebouxiophyceae* sp., *Tetradismus obliquus*, *Coelastrella* sp., *Stichococcus bacillaris* (clorofitas) y *Porphyridium* sp. (rodofita).

Se estudiaron dos posibles aplicaciones biotecnológicas de los aislados: por una parte, se determinó su tolerancia a cadmio, cobre, hierro o plomo a ambos pHs como una posible utilización para la eliminación de dichos metales del medio ambiente y por otra parte se estudió la capacidad de síntesis de nanopartículas de plata a partir del caldo de cinco de los aislados. y su posible actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 y la Gram

¹ SJP=San Juan del Puerto; E=Eucariota; B=Bajamar; A=Pleamar; P=primavera; O=Otoño, I=Invierno

positiva *Staphylococcus epidermidis* ATCC6538P. Del estudio de la tolerancia de los aislados de microalgas a diferentes concentraciones de metales se observó que los aislados con mejor tolerancia a cadmio fueron *Trebouxiophyceae* sp. y *Porphyridium* sp. a cobre *Coelastrella* sp. y *Porphyridium* sp. a hierro, *S. bacillaris* y a Pb *Trebouxiophyceae* sp. A través de la microscopía óptica, fue posible detectar variaciones morfológicas de las células debidas a la exposición a los metales y en muchos casos la producción de un mucílago extracelular no presente en los cultivos control. Se observó la adsorción a la superficie celular o al mucílago de los metales cadmio y plomo en los cultivos de *Parachlorella* sp. y *Coelastrella* sp. y de hierro en los cultivos de *Parachlorella* sp. y *T. obliquus* todos ellos a pH7, así como para los cultivos de *Coelastrella* sp. a los pHs 4 y 7. Las clorofitas aisladas en este trabajo mostraron, tanto a pH4 como a pH7, la capacidad de producir extracelularmente nanopartículas de plata. Se llevó a cabo el estudio de la cinética de producción y de la estabilidad de las mismas dependiendo de la fase del crecimiento del cultivo de la microalga utilizado. Las nanopartículas producidas a partir de los cultivos que se encontraban en fase estacionaria presentaron mayor estabilidad en todos los casos. La actividad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas fue mayor frente a *S. epidermidis* que a *E. coli* y *K. pneumoniae* siendo las producidas a partir de los aislados *Parachlorella* sp. y *Trebouxiophyceae* sp. las que mostraron mayor actividad frente a las tres bacterias utilizadas.

ABSTRACT

There are no reports about the microbial diversity in the intertidal zone in the acidic ecosystem of RíoTinto (Huelva, Spain). In this study, we found San Juan del Puerto to be the farthest spot from the river mouth along the river in which environmental and geochemical conditions change together with the tidal cycle twice a day. Seasonal bacterial diversity has been studied during one year with maximal and minimum tidal difference and it has been compared with the sampling spot of La Rábida, which is in the mouth of the river. Acidophilic microorganisms have been found in the low tide samples like *Acidocella*, *Acidobacterium*, *Acidiphilium* and *Ferromicrobium*, genera. Iron oxidizing denitrifying *Acidovorax* genera has been found in different water samples in this study. Some genera from oceanic samples have been found in low tide samples, like *Arcobacter*, *Methylophaga*, *Mesorhizobium*, *Marinobacter*, *Flavobacterium* and *Pseudomonas*. Likewise, *Marinomonas*, *Limnobacter* and *Rhodobacter*. genera have not been found in these samples. A correspondence analysis (PCA and CCA) has been performed integrating biological diversity results with physical-chemical measurements: it shows high correlation between acidophilic microorganisms, low tide samples and heavy metal presence. High tide samples, even if more dispersed, reveals a clear oceanic influence showing a certain correlation with high conductivity, salinity, pH and chlorine concentration.

From high and low tide samples in winter and spring, and from low tide sample in autumn in San Juan del Puerto, six microalgae isolates have been obtained and named as: SJP_EBP_1, SJP_EAP_2, SJP_EBO_3, SJP_EBO_4, SJP_EBI_5², cultured in BG11 medium (pH7 and pH4) and SJP_EAI_6 in L1 medium at pH7. In order to characterize these microalgae, 18S rRNA has been sequenced and analysed. They were identified as five chlorophytes and a rhodophyte: *Parachlorella* sp., *Trebouxiophyceae* sp., *Tetradesmus obliquus*, *Coelastrella* sp., *Stichococcus bacillaris* and *Porphyridium* sp.

Two possible biotechnological applications have been studied in this work: on one side their potential in removing metal pollution from aqueous solution and on the other their capability to synthesize silver nanoparticles.

The tolerance assay on different concentrations of cadmium, copper, iron and lead revealed that *Trebouxiophyceae* sp. and *Porphyridium* sp. show a better tolerance to cadmium, *Coelastrella* sp. and *Porphyridium* sp. to copper, *S. bacillaris* to iron and *Trebouxiophyceae* sp. to lead. By optical microscopy, morphometric variations due to the metal exposure have been detected as well as an extracellular mucilage in the majority of the samples that were not observed in controls. Adsorption of cadmium and lead has been observed in *Parachlorella* sp. and *Coelastrella* sp. cultivated at pH7, of iron in *Parachlorella* sp. and *T. obliquus* cultivated at pH7 and in *Coelastrella* sp. culture at pH4 and pH7.

The chlorophytes isolated in this work showed, at both pH4 and pH7, the ability to

² SJP= San Juan del Puerto; E=Eukaryotic; B=low tide; A=high tide; P=spring; O=autumn; I=winter.

produce extracellularly silver nanoparticles. Their antibacterial activities have been studied on Gram negative *Escherichia coli* ATCC10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 and Gram positive *Staphylococcus epidermidis* ATCC6538P. The study of the kinetics of production and of the stability of the nanoparticles has been carried out depending on the phase of growth of the microalga culture used. The nanoparticles produced in stationary phase presented greater stability in all the cases. The antibacterial activity of the nanoparticles synthesized from the isolated microalgae was higher compared to *S. epidermidis* than to *E. coli* and *K. pneumoniae* being the nanoparticles produced from the isolates *Parachlorella* sp. and *Trebouxiophyceae* sp. the ones that showed greater activity against the three bacteria used.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directores de tesis Irma Marín y Ricardo Amils la oportunidad de haber podido desarrollar este proyecto en su grupo de investigación, bajo su dirección.

A Irma porque me ha guiado durante este largo trayecto que no ha sido siempre fácil. He aprendido de ella la perseverancia y la fuerza; gracias, por haberme hecho crecer durante estos años codo a codo.

A Ricardo, por su conocimiento, apoyo y cariño durante todos estos años. Y porque me ha invitado al jamón del bueno mientras subía la marea, que para algo hemos elegido río Tinto.

A Pascual, por haberme hecho descubrir en el pequeño, grande mundo de las nanopartículas, por haber dirigido esa parte del trabajo, y por el esfuerzo en días y en horas impensables junto con Irma.

A Lilia, que me enseñó la diferencia entre una p1000 y una p10 y especialmente a decir que “sí” o que “no” a la primera, cuando todavía no sabía hablar castellano. Gracias.

A todo el grupo repartido en los varios departamentos de la facultad, en el CBM y en el CAB.

A Ángeles, que me ha enseñado a utilizar el OxiPAM y porque tiene a *Chlamydomonas* y me da sana envidia. A Helena, que me ha enseñado que el señor CANOCO siempre te da una segunda oportunidad.

A todo el departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. A mis profesores del máster de Microbiología, especialmente a Mari Carmen (que es la responsable de haberme metido en este micromundo) y a Pepe.

A Concha, porque he aprendido más de lo que se imagina de ella y por haber sido un gran apoyo, pero especialmente porque me ha enseñado a hacer el mejor salmorejo del mundo.

A José Luis, por su curiosidad, por la manera de transmitir conocimiento se trate de reactores UASB o de la *caipirinha*, con la misma entrega. A Nuria, Monike, Moustá y a Patri, porque de tantos años que llevamos, son casi familia. A Emiliano y a Mirna, por haberle dado significado a las palabras esfuerzo e ingenio, por haberlo pasado bien en la temporada intensa en la que pedimos la beca a Repsol. A Santi por habernos ayudado si teníamos alguna tragedia con la autoclave/agua/pHmetro/espectrofotómetro etc., con la sonrisa en la cara.

A los que han movido sus pasos en la investigación en nuestro departamento: Edu, Gerardo, Benedito, Héctor, Sara, Pablete y Mónica. A Aldo, por las charlas nocturnas y por haberme regalado la historia de su juventud chilena.

A mis maravillosos compañeros de laboratorio y mejores amigos Nicolás, Ana y Ana, porque habéis hecho de estos años una experiencia inolvidable, gracias por la ayuda y las risas. A Nico, porque demuestra las cosas con los hechos, porque parte de su idioma está en mi vocabulario y porque sigue estando, aunque esté lejos. A Ana

Morato, porque si se me ha pegado una centava parte de su energía, entusiasmo, optimismo y fuerza, me doy por satisfecha. A Ana Morro, porque nos entendemos sin hablar y porque sin ella no sé cómo lo habría hecho, porque lo hemos pasado muy bien juntas, porque parece que somos diferentes, pero no tanto. Gracias.

A Paco y Nieves, por haberme querido como a una hija. A Nurita, por haber sido y seguir siendo un apoyo incondicional, por creer en mí, por el entusiasmo, porque me ha enseñado a dar a las cosas el valor que tienen. Porque más que todo, no conoce la maldad, Gracias.

A mis amigas María y Carol, que son mi Madrid. A mis amigas desperdigadas por el mundo Giulia, Annachiara, Flavia, Betta y Maria Ludovica, que son mujeres de otro planeta. A mi *cara* amiga Mónica, porque sin ella, no lo habría hecho, porque he aprendido mucho de ella, porque me ha ayudado con este trabajo y porque me lleva los pies a la Tierra.

A Andrea, por haberme ayudado a revisar las doscientocinquantaysiete citas bibliográficas, porque escucha, porque me enseña cada día que se puede evolucionar, porque me río mucho, y por todo lo que nos queda.

A toda mi libre familia.

A Simone, que está luchando. A mi hermana Francesca que me dice que soy guapa, aunque esté hecha un adefesio y tenga las ojeras hasta las rodillas.

A mis abuelos, siempre.

A mis padres, Madia y Francesco, porque no podría haber tenido más suerte, porque me han enseñado la educación y el respeto hacia el prójimo, el valor de la cultura; porque me han enseñado a adaptarme a los cambios, y que la sustancia es más importante que la forma.

ABREVIATURAS

AgCl	Cloruro de plata
bp	Pares de bases
c/u	Cada uno
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CCD	Dispositivo de carga acoplada
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
Fig/Figs	Figura, Figuras
h	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IR	infrarrojo
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standard
L	Litros
M	Molar
ND	No determinado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Redox	Reacción de Óxido-Reducción
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
t	Tiempo
U	Unidades
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Radiación ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
µg	Microgramos
µL	Microlitros

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas.....	4
1.1.1	Microorganismos acidófilos.....	5
1.2	Las microalgas y su potencial biotecnológico.....	5
1.2.1	Biorremediación	8
1.2.2	Producción de nanopartículas (NPs).....	11
1.2.2.1	Nanopartículas de plata (AgNPs)	13
1.3	El Río Tinto.....	15
1.3.1	Estuario del Tinto.....	18
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1	Reactivos utilizados.....	27
3.2	Recogida de muestras	28
3.3	Medios de cultivo.....	29
3.4	Análisis de la diversidad microbiana.....	29
3.4.1	Cebadores utilizados.....	29
3.4.2	Extracción de dna total y amplificación del gen ribosomal 16s rna	30
3.4.3	Clonación de los amplicones de 16s rdna.....	31
3.4.4	Purificación de los productos de pcr y secuenciación	31
3.4.5	Ensamblaje y alineamiento de secuencias.....	32
3.4.6	Análisis estadístico de los resultados.....	32
3.4.6.1	Índices de diversidad	33
3.5	Aislamiento, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de los aislados microalgales	34
3.5.1	Aislamiento de microalgas.....	34
3.5.1.1	Aislamiento mediante estrías en placa	34
3.5.1.2	Aislamiento en medio líquido mediante diluciones seriadas	34
3.5.1.3	Seguimiento del crecimiento de las microalgas	34
3.5.2	Caracterización de los cultivos.....	35
3.5.2.1	Microscopía óptica	35
3.5.2.2	Caracterización mediante técnicas moleculares	35
3.5.3	Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas aisladas.....	35
3.5.3.1	Efecto de cadmio, cobre, hierro y plomo sobre las microalgas aisladas	35
3.5.3.2	Producción de nanopartículas de plata a partir de caldos de cultivo de microalgas.	
	Caracterización físico-química y de sus propiedades antibacterianas	37

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1	Diversidad microbiana en la zona de influencia mareal.....	41
4.1.1	Análisis físico-químicos	41
4.1.2	Análisis elemental.....	42
4.1.3	Análisis estadístico	43
4.1.4	San Juan del Puerto y La Rábida.....	45
4.1.5	Análisis de la diversidad microbiana.....	47
4.1.5.1	Clonación del gen 16s rRNA	47
4.1.5.2	Índices de diversidad	54
4.1.6	Relación entre características físico-químicas y comunidad bacteriana	56
4.2	Identificación, caracterización y aplicaciones de los aislados microalgales.....	58
4.2.1	Identificación y caracterización de los aislados microalgales	58
4.2.1.1	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBP_1	59
4.2.1.2	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBP_2	62
4.2.1.3	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBO_3	64
4.2.1.4	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBO_4	66
4.2.1.5	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBI_5	68
4.2.1.6	Identificación y caracterización del aislado SJP_EBO_6	70
4.2.2	Ensayos de aplicaciones biotecnológicas de los aislados microalgales	73
4.2.2.1	Estudio de tolerancia frente a diferentes concentraciones de metales	73
4.2.2.2	Producción biológica y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs)	100
4.3	Consideraciones generales.....	114
5	CONCLUSIONES	115
6	BIBLIOGRAFÍA	119
Anexo I		137
	Diversidad microbiana en la zona de influencia mareal.....	137
Anexo II		165
	Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas aisladas.....	165

1 INTRODUCCIÓN

El componente vital más ubicuo en la naturaleza es el formado por los microorganismos, constituyendo el 60% de la biomasa total terrestre. Éstos constituyen un grupo amplio y muy diverso con representantes de los tres dominios: *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya* (algas, hongos y protozoos) y de los virus. Son capaces de producir más fotosíntesis que las plantas y pueden llegar a ser hasta el 90% de las células presentes en un ser vivo. Desde un punto de vista tecnológico, su principal importancia radica en que son capaces de producir una enorme variedad de moléculas útiles para el ser humano y que han contribuido a que durante los últimos 100 años se desarrolle la llamada Biotecnología Microbiana (Demain, 2000; Demain y Adrio, 2008; Tang y Zhao, 2009). Históricamente algunos microorganismos han suministrado productos fermentados tales como cerveza, vino, pan, queso a la humanidad incluso antes de que se conociese que eran seres vivos los involucrados en sus procesos de producción. En tiempos más recientes la producción de materiales fermentados desembocó en la denominada Microbiología Industrial tradicional. A principio del siglo XX comienza la era de las fermentaciones industriales que da lugar a la producción de sustancias más específicas como por ejemplo ácidos orgánicos, vitaminas o enzimas a gran escala, así como al desarrollo de los primeros procesos de producción de antibióticos, tales como la penicilina o estreptomicina, contribuyendo a la implantación de la Ingeniería Bioquímica. La Biotecnología moderna emerge a finales del siglo XX con la posibilidad de modificar y transferir genes de un microorganismo a otro gracias a las técnicas de DNA recombinante desarrolladas unos años antes. Inicialmente el enfoque de estas tecnologías fue en aspectos relacionados con la salud, obteniéndose una enorme cantidad de productos biofarmacéuticos como antibióticos, vacunas, hormonas, etc. En las últimas décadas se ha producido un incremento considerable del uso de microorganismos en distintos campos tales como la industria alimentaria, por ejemplo con el desarrollo de aditivos alimentarios y de nuevos alimentos y bebidas, la agricultura y la ganadería, con la producción de biofertilizantes, insecticidas biológicos y piensos así como con la generación de plantas transgénicas más resistentes a plagas, enfermedades, sequía, etc., o en relación al medioambiente, con el desarrollo de procesos de tratamiento de residuos, de producción de energía a partir de biomasa, de elaboración de polímeros biodegradables o en metodologías de biorremediación, entre otros (Demain y Adrio, 2008; Tang y Zhao, 2009). Como hemos relatado, los microorganismos son capaces de producir una gran variedad de productos de enorme interés biotecnológico y la principal razón de que se utilicen de forma masiva en vez de a partir de plantas o animales o incluso ser obtenidos por síntesis química, radica en que los microorganismos poseen la mayor diversidad genética y metabólica conocida, pudiendo llevar a cabo una gran variedad de reacciones, pueden adaptarse con facilidad a diferentes condiciones ambientales y es posible manipularlos genéticamente de una forma relativamente sencilla para incrementar la producción de un compuesto determinado o para modificar la estructura de un compuesto para conseguir nuevos productos con distintas actividades y aplicaciones (Demain y Adrio, 2008). La búsqueda de microorganismos que puedan producir enzimas capaces de resistir determinadas condiciones de los procesos industriales es una de las mayores

actividades de la Biotecnología. Entre estos, los microorganismos extremófilos son una opción que ha sido desarrollada durante las últimas décadas.

1.1 EXTREMÓFILOS Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Los microorganismos que son capaces de sobrevivir y crecer bajo condiciones ambientales extremas reciben el nombre de extremófilos, término que fue acuñado por MacElroy en 1974. Su descubrimiento supuso una auténtica revolución en el campo de la Biología (MacElroy, 1974) con importantes repercusiones no solo en los aspectos fundamentales de la misma, sino porque abrió nuevos caminos en la industria biotecnológica y distintos campos de investigación (Rothschild y Mancinelli, 2001; Gomes y Steiner, 2004; Sharma y col., 2012; Dalmaso y col., 2015) incluyendo el poder considerar la posibilidad de la existencia de vida fuera de la Tierra (Morrison, 2001; Corkrey y col., 2017). Estos microorganismos son capaces de desarrollarse en condiciones que habían sido consideradas como imposibles, originalmente, y como difíciles, más adelante, para la vida, como pueden ser las temperaturas extremadamente altas (de 55°C a 122°C) o bajas (de -2°C a -20°C), la salinidad elevada (2-5 M de NaCl o KCl), los pHs bajos o altos (de 0 a 11,5), o la baja actividad de agua, entre otras, así como las combinaciones entre ellas, hablándose en algunos casos de ambientes multiextremos, lo que contribuye a que la presencia de microorganismos puedan encontrarse en una diversidad de ambientes terrestres o acuáticos muy extensa (Rothschild y Mancinelli, 2001; Cantrell y col., 2011; Rampelotto, 2013; Seckbach y Rampelotto, 2015; Dhakar y Pandey, 2016). En la actualidad considerando el auge de las tecnologías limpias y las necesidades mundiales de sostenibilidad, los enzimas pueden ser una alternativa más ecológica para llevar a cabo transformaciones químicas. Son biodegradables, catalizadores eficientes y selectivos, no poseen toxicidad y su producción respeta el medio ambiente (Van Den Burg, 2003; Baweja y col., 2016; Santiago y col., 2016). Según describe Dewan, el mercado de la industria enzimática llegará a 7.100 millones de dólares en el 2018 (Dewan y Setia, 2014). Es por ello que en los últimos años se ha producido un aumento en la búsqueda de extremozimas, enzimas provenientes de microorganismos extremófilos, que puedan ser activas en condiciones de trabajo más agresivas. Los usos son muy diversos entre los que se encuentran la degradación de polímeros como quitina, celulosa o almidón, la síntesis de productos farmacéuticos con enzimas resistentes a altas temperaturas o biocatalizadores procedentes de microorganismos halófilos que se pueden utilizar en medios no acuosos (Van Den Burg, 2003; Dhakar y Pandey, 2016). Otras aplicaciones de los microorganismos extremófilos son las relacionadas con la biominería o la biorremediación, la utilización de proteínas anticongelantes como crioprotectores de órganos congelados, su uso como suplementos nutricionales y antioxidantes, o en la producción de energía mediante biopilas (Malki y col., 2008; Carbajosa y col., 2010; Dhakar y Pandey, 2016).

1.1.1 MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS

Los microorganismos acidófilos requieren un pH ácido para crecer con valores óptimos entre 3 y 4 (Jaenicke, 1981). Sus hábitats más comunes son las zonas volcánicas e hidrotermales o las minas en activo o abandonadas, u otros como el río Tinto en el suroeste de la Península Ibérica. Las comunidades microbianas en estos ambientes están formadas por bacterias y arqueas, entre las que encontramos representantes de *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus*, *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Thermoplasma*, entre otros, pero también especies de eucariotas pertenecientes a diferentes géneros de Bacillariophyta (*Pinnularia*), Euglenophyta (*Euglena mutabilis*), Rhodophyta (*Cyanidium*), Chlorophyta (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*), Streptophyta (*Zygnemopsis*, *Klebsormidium*), de amebas (*Vahlkampfi*, *Naegleria*), de heliozoos (*Actinophrys*), de flagelados (*Bodo*, *Cercomonas*, *Ochromonas*, *Labyrinthula*), ciliados (*Oxytricha*, *Colpidium*), de rotíferos (*Rotaria*) y de hongos (*Rhodotorula*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Trichosporon*) (López-Archilla y col., 1993; López-Archilla y col., 2001; López-Archilla y col., 2004; Aguilera y col., 2006a; Schouten y col., 2008; Baker y col., 2009; Amaral Zettler, 2012; Aguilera, 2013; Mangold y col., 2013). Los acidófilos han diseñado diferentes mecanismos por los que las condiciones internas de pH son estables y diferentes de las de los medios en los que habitan. Algunos de ellos son muy conocidos como que los lípidos de las membranas en los acidófilos están compuestas por éteres de glicerol, más resistentes a los pH bajos que los ésteres presentes habitualmente en las membranas, o que en algunas arqueas, como en el caso bien estudiado de *Thermoplasma acidophilum*, su membrana plasmática posee una estructura de monocapa lipídica con tetraéteres de diglicerol, que es más impermeable y resistente a las condiciones extremas (Konings y col., 2002; Dhakar y Pandey, 2016). En cuanto a la adaptación de las proteínas de organismos acidófilos para poder mantenerse activas en las condiciones ambientales en las que viven, se han descrito varios mecanismos entre los que se encuentran la reducción del número de puentes salinos que intervienen en la estructura tridimensional o cambios en el sitio activo y en la superficie enzimática que facilitan la actividad funcional a bajo pH (Michaux y col., 2010). Los enzimas de los microorganismos acidófilos tienen un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas e industriales en la producción de etanol o biofuel, o en la hidrólisis de materiales celulósicos mediante enzimas celulolíticas o xilanolíticas que son capaces de trabajar a pHs bajos (Cannio y col., 2004; Jackson y col., 2007).

1.2 LAS MICROALGAS Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos eucarióticos fotosintéticos de rápido crecimiento con la capacidad de desarrollarse en una gran diversidad de ambientes acuáticos o terrestres (Rajvanshi y Sharma, 2012; Hamed y col., 2017). Son de gran interés biológico debido a que se consideran productores primarios proveyendo de nutrientes y oxígeno a otras muchas especies. Los grupos más estudiados pertenecen a los filos Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas rojas),

Phaeophyta (algas pardas), Bacillariophyta (diatomeas) y Chrysophyta (algas doradas o verde-amarillas) (Mata y col., 2010). La biotecnología de microalgas se ha desarrollado debido a la gran diversidad de productos que se pueden obtener a partir de su biomasa. Los cambios climáticos que se están produciendo y los problemas futuros de abastecimiento de comida y energía, han hecho de las microalgas uno de los campos de estudio con más proyección de futuro en nuestros días (Waltz, 2009; Hannon y col., 2010; Wijffels y Barbosa, 2010; Saifullah y col., 2014; Hamed y col., 2017).

Actualmente son muchas las industrias que producen microalgas con diversas finalidades (Tab. 1) tales como su uso en alimentación humana o animal, su empleo como fertilizantes, para producción de diversos compuestos como pigmentos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) o productos farmacéuticos, para aplicaciones en cosmética (Yaakob y col., 2014; Wang y col., 2015), o para la obtención de productos combustibles como fuente de energía (biodiesel, bioetanol y biohidrógeno) (Chew y col., 2017).

Tabla 1. Especies de microalgas con interés industrial, productos principales y usos. Modificada de la publicada por Liu y col., 2016.

Filo	Especie	Producto	Áreas de aplicación
Bacillariophyta	<i>Odontella aurita</i>	Ácidos grasos (EPA, DHA)	Productos farmacéuticos, cosmética, comida infantil
	<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Carotenoides (fucoxantina), ácidos grasos (EPA)	Productos farmacéuticos, cosmética, nutrición animal
Haptophyta	<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos grasos (DHA)	Nutrición animal
Chlorophyta	<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasa, factor de crecimiento (CGF), clorofila II	Alimentos saludables, suplementos dietéticos, aditivos alimentarios,
	<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoides (β -caroteno)	Suplementos de la dieta, cosmética
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenoides (astaxantina)	Alimentos saludables, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios
	<i>Muriellopsis</i> sp.	Carotenoides, luteína	Alimentos saludables, complementos alimentarios, piensos
	<i>Porphyridium cruentum</i>	Polisacáridos, Ácidos grasos (EPA, DHA), ficoeritrinas	Productos farmacéuticos, cosmética, nutrición, espesantes
Rhodophyta	<i>Porphyridium</i> sp.	Ficoeritrinas	Cosmética

Algunos estudios recientes han mostrado la potencial utilidad de ciertas algas en la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados o en el campo emergente de la síntesis biológica de nanopartículas metálicas con propiedades de interés biotecnológico (Kumar y col., 2015; Shankar y col., 2016; Zeraatkar y col., 2016). La mayor parte de los productos de interés industrial relacionados con las microalgas, derivan de su biomasa, habiéndose despreciado hasta hace poco tiempo el potencial de los productos bioactivos contenidos en los caldos de cultivo de estos organismos.

En los últimos años se han identificado las estructuras y propiedades de algunos de estos metabolitos que han abierto nuevas posibilidades para su utilización como productos de alto valor comercial incluyendo enzimas diversas, ácidos orgánicos, hidrocarburos, metanol, fitohormonas, compuestos alelopáticos, etc. (Liu y col., 2016). Entre estos productos se encuentran los polisacáridos extracelulares (EPS), algunos de los cuales poseen actividades con diferentes aplicaciones farmacéuticas como antitumorales, anti-inflamatorios o antivirales. Algunos tienen utilidad en otros diversos campos como alimentación humana y animal, cosmética y biorremediación de metales y vertidos de petróleo (Liu y col. 2016). Los EPS son producidos por los microorganismos durante el crecimiento celular considerándose que su función biológica principal radica en proteger a las células del estrés producido por condiciones ambientales desfavorables. Estas sustancias pueden quedar unidos a la pared celular o ser liberados al medio. Algunos de los EPS producidos por ciertas microalgas se han caracterizado estructuralmente determinándose sus posibles aplicaciones (Tab. 2).

Tabla 2. Especies de microalgas productoras de EPS, actividad del EPS y posible aplicación. Modificada de la publicada por Liu y col., 2016.

Filo	Especie	Bioactividad y aplicación	Referencia
Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	Actividad antiviral, antimicrobiana, antitumoral, inmunomodulación	(Dvir y col., 2000; Huang y col., 2005; Sun y col., 2012)
	<i>Porphyridium</i> sp.	Disminución del colesterol	(Dvir y col., 2000; Dvir y col., 2009)
	<i>Rhodella reticulata</i>	Captación de radicales libres, antioxidante	(Chen y col., 2010)
Chlorophyta	<i>Chlorella stigmatophora</i> LB993	Biorremediación metales	(Kaplan y col., 1987)
Dinoflagellata	<i>Gyrodinium impudicum</i>	Antiviral	(Yim y col., 2004)

Ejemplos de estos estudios son los llevado a cabo sobre el EPS de *Chlorella stigmatophora* en los que se determinó que está constituido por derivados ácidos de monosacáridos tales como ácidos urónicos o sulfatados, que sirven al organismo para acomplejar iones Zn^{2+} y Cd^{2+} presentes en el medio, protegiéndose así de los efectos tóxicos de éstos (Kaplan y col., 1987; Freire-Nordi y col., 2005).

De entre las posibles aplicaciones de las microalgas con mayor proyección de futuro se encuentran la biorremediación de metales pesados de ambientes acuáticos y la producción biológica de nanopartículas metálicas a partir de los caldos de cultivo de los microorganismos. Esta última aplicación podría ser utilizada en el desarrollo de microalgas como biofactorías (la utilización de bioproductos o procesos de estos organismos para optimizar rendimientos económicos) (Chew y col., 2017), ya que no requiere el empleo de la propia biomasa de éstas.

1.2.1 BIORREMEDIACIÓN

La Biorremediación es la recuperación de ambientes contaminados mediante la utilización de organismos biológicos. La contaminación por metales pesados es una de las más extendidas en todo el mundo. Estos metales presentan una elevada toxicidad incluso a concentraciones muy bajas, se acumulan en los organismos a través de la cadena trófica, no son degradables y pueden provocar problemas graves de salud (He y Chen, 2014; Zeraatkar y col., 2016). Los metales que se encuentran de una forma más generalizada en el medioambiente son plomo, cobre, cadmio, zinc y níquel. El plomo es uno de los más tóxicos pudiendo causar daños al sistema nervioso y a los riñones (ATSDR, 2007), mientras que el níquel es carcinogénico y el cadmio provoca daños en riñón, da lugar a pérdidas de minerales de los huesos y afecta a los pulmones disminuyendo su funcionalidad (ATSDR 2012).

Se han utilizado diferentes tecnologías físico-químicas para la descontaminación de metales de aguas y suelos tales como precipitación química y adsorción o filtración por membranas (Dąbrowski y col., 2004; Goharshadi y Moghaddam, 2015), sin embargo los elevados costes energéticos asociados y de los productos químicos utilizados a escala industrial y la eliminación incompleta de los metales que se consigue han hecho que este tipo de aproximaciones no hayan tenido el éxito deseado (Oboh y col., 2009; Kumar y col., 2015; Zeraatkar y col., 2016).

La gran presión social y el interés de la comunidad científica para la búsqueda de métodos eficientes, con bajo costo y sostenibles capaces de eliminar los metales de los cuerpos de agua ha conducido a la realización de esfuerzos para el desarrollo de métodos biológicos de remediación, esto es de biorremediación. El uso de tecnologías biológicas para remediar ambientes contaminados con metales puede basarse en mecanismos tales como: i) la precipitación o acumulación extracelular facilitada por microorganismos viables; ii) la biosorción, o unión del metal a la superficie celular del organismo biorremediador o a la biomasa (proceso pasivo por el que el metal se une a grupos funcionales que se encuentran en la superficie celular tales como grupos hidroxilo, carboxilo, amino, etc.) y iii) la bioacumulación, proceso en el que las células introducen el contaminante en el interior celular mediante un proceso metabólico activo con gasto energético, por lo que se requiere que el organismo biorremediador se encuentre vivo y metabólicamente activo.

Estos procesos tienen ventajas con respecto a otros métodos clásicos en cuanto al menor coste, a la alta eficiencia en la eliminación de los metales, aun cuando se trate de soluciones muy diluidas, y por supuesto al valor añadido que supone la recuperación del metal, sobre todo de aquellos con alto valor económico y en particular si la recuperación es selectiva o específica de un determinado metal.

En las últimas décadas se ha probado la utilidad del uso en biorremediación de metales de una gran diversidad de organismos, entre los que se encuentran bacterias (o exopolisacáridos bacterianos), plantas acuáticas o terrestres, hongos, algas o musgos y líquenes, sea en procesos de biosorción o de bioacumulación (Sandau y col., 1996; Rayson y Williams, 2011; Mishra y Rhee, 2014; Kumar y col., 2015). De entre todos los grupos de organismos estudiados, los hongos parecen ser los más versátiles ya que

pueden unir a su superficie una gran diversidad de cationes metálicos como hierro, níquel, zinc, plata, cadmio, etc. y son capaces de bioacumular metales pesados a partir de soluciones acuosas de éstos. Las plantas y las algas se han utilizado principalmente como materiales de biosorción (Doshi y col., 2006; Zeraatkar y col., 2016). En el caso de las bacterias uno de los grupos más estudiados han sido las sulfatorreductoras, capaces de biorremediar mediante la precipitación de sulfuros metálicos. Los principales problemas de la utilización de este tipo de microorganismos son los largos tiempos de generación y la necesidad de añadir suplementos orgánicos coadyuvantes para su cultivo en reactores (Perales-Vela y col., 2006).

Las microalgas poseen una serie de características que las hacen particularmente interesantes para su uso en procesos de biorremediación, ya que pueden recuperar metales con biomasa viva o muerta. En el caso de la biosorción, la unión del metal a la superficie es muy rápida lo que permite acortar el tiempo del proceso y disminuir los requerimientos energéticos, por lo que se considera un proceso ecológico.

Las microalgas por otra parte son fáciles de manejar y cultivar en sistemas continuos o discontinuos, aerobios o anaerobios sin requerimientos de nutrientes específicos, crecen rápidamente si se comparan con las plantas y no producen residuos tóxicos. En algunos casos son capaces de unir cantidades notables de metales siendo altamente selectivas (Kumar y col., 2015). Durante las dos últimas décadas los principales estudios de biosorción con microalgas se han centrado en tres grupos: algas pardas (Davis y col., 2003; Lodeiro y col., 2005; Luna y col., 2010; Kleinübing y col., 2011), algas verdes (Deng y col., 2009; Zakhama y col., 2011; Maznah y col., 2012) y algas rojas (Ibrahim, 2011). Las paredes celulares de los distintos grupos son muy diferentes y las posibilidades de ser utilizadas en procesos de biorremediación dependen en gran medida de ellas. Las paredes celulares de todos estos tipos de algas contienen celulosa, como componente estructural, que se encuentra acompañada de otros más específicos dependiendo del tipo de alga, así las de las algas pardas contienen ácido alginico y polisacáridos complejos de diferente naturaleza constituidos por derivados ácidos de monosacáridos, tales como los ácidos manurónico o gulurónico, unidos a metales como sodio, potasio, magnesio o calcio (Romera y col., 2007). Las de las algas verdes presentan un alto contenido en proteínas unidas a polisacáridos aportando grupos funcionales como aminos, carboxilos, sulfidrilos e hidroxilos que pueden jugar un importante papel en la biosorción. Las algas rojas por su parte contienen polisacáridos, principalmente galactanos sulfatados. Brinza (2007) y He (2014) recopilaron una lista de microalgas con capacidad de biosorción de una gran diversidad de metales incluyendo *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella salina*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella miniata*, *Chlorococcum* spp., *Cyclotella cryptica*, *Lyngbya taylorii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium purpureum*, *Scenedesmus abundans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus*, *Spirogyra* spp., *Stichococcus bacillaris* y *Stigeoclonium tenue* (Brinza y col., 2007; He y Chen, 2014). Entre los organismos más utilizados en biorremediación de metales se encuentran *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tanto en procesos utilizando biomasa muerta como viva. En estos estudios *Chlorella* spp. se han probado en un rango de pH entre 2 y 7.4 para biorremediar aguas contaminadas con Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y Cr^{6+} , en

forma de biomasa no viva en el rango indicado de pH o de microorganismos vivos casi exclusivamente, a pHs próximos a la neutralidad. Distintas especies de *Scenedesmus* se han probado para los mismos metales indicados anteriormente a excepción del Fe^{3+} , a valores de pH entre 2 y 7 para biomasa muerta y a pHs entre 6 y 8 en los pocos casos en los que se ha descrito la utilización de microorganismos vivos (Kumar y col., 2015). En un estudio realizado por Matsunaga y col., (1999), se probaron 191 algas marinas para la descontaminación de agua de mar contaminada con Cd y encontraron que la cepa de *Chlorella* sp. NKG16014 fue la que mostró una mayor capacidad de retirar el metal, con 67% del metal acumulado intracelularmente y un 25% adsorbido en la superficie celular. Igualmente Pérez-Rama y col., describieron el mismo efecto en otros cultivos de microalgas marinas (Matsunaga y col., 1999; Pérez-Rama y col., 2002). A pesar de que las microalgas poseen diferentes mecanismos para sobrevivir en ambientes donde la concentración de metales es elevada, hay varios factores que pueden afectar a la toxicidad que ejerzan estos compuestos sobre los microorganismos. Existen factores de diversos tipos que afectan a los procesos de biorremediación de metales y que pueden agruparse en: i) factores **bióticos**, tales como los requerimientos nutricionales y físico-químicos y el ciclo de vida de los microorganismos, su tolerancia a los metales y el tamaño celular, que condiciona la superficie de exposición, todo lo cual puede ser diferente dependiendo de la especie taxonómica a la que el alga pertenezca, e incluso de la cepa, y ii) factores **abióticos** que incluyen la naturaleza del metal (peso atómico y estado de oxidación), su concentración así como la presencia de otros metales en la solución y factores físico-químicos de ésta (potencial redox, pH, temperatura, salinidad), además de la presencia de sustancias que dificulten o impidan la interacción de los metales con la superficie de las células (materia orgánica, ácidos húmicos, EPS) (Dönmez y col., 1999; Monteiro y Cunningham, 2012).

Los factores bióticos son relevantes principalmente en los procesos de bioacumulación, mientras que los abióticos lo son tanto en estos como en los de biosorción. El pH es posiblemente el factor que más influye en la acumulación de metales ya que se puede considerar como un factor biótico y abiótico. Afecta al crecimiento del microorganismo y a la adsorción del metal sobre la superficie celular. Como factor abiótico está relacionado con la química de los metales en solución y las propiedades acido-base de los grupos funcionales que se encuentran en la superficie celular de las microalgas (Brinza y col., 2007; Monteiro y Cunningham, 2012; Jebakumar y Sethuraman, 2013; Indhumathi y col., 2014). En este sentido, a pH bajo algunos de los ligandos que unen los metales podrían estar cargados positivamente o no tener carga lo que produciría respectivamente una repulsión de los cationes metálicos o una falta de interacción. Sin embargo, si el pH se incrementa, algunos de los grupos que se encuentran en la superficie celular podrían adquirir carga negativa la unión del metal a la célula o la disminución de carga positiva evitando así repulsiones con los cationes. Otro efecto negativo de los pHs elevados podría ser la precipitación de los metales disminuyendo de esta forma la cantidad del metal en solución.

Por ello es importante determinar el pH óptimo para qué, sin afectar el crecimiento del microorganismo (en el caso de procesos de bioacumulación), se pueda producir la interacción entre la microalga (viva/muerta) y el metal, habiéndose descrito la existencia

de relaciones especie-específicas entre el pH y la adsorción del metal por la célula (Wilde y Benemann, 1993). Por otro lado Starý y col., (1983) describieron que el efecto del pH en la toxicidad del metal es muy compleja y depende de la especie metálica. Estos autores observaron que la remediación de metales como Zn o Cd por *Scenedesmus obliquus* era lineal con el pH en el rango 5-9, mientras que la unión del Hg era totalmente independiente del pH (Starý y col., 1983). También se ha descrito que los distintos grupos que se pueden encontrar en la superficie celular pueden ser más o menos dominantes en la adsorción de un determinado metal dependiendo del pH. Los grupos carboxilos dominan en el rango de pH de 2-5, mientras que los grupos fosfato lo hacen entre 5-9, entrando en juego grupos como fosfato, hidroxilo o amino a pHs de 9-12. Rangos que están relacionados con los valores de pKa de dichos grupos (Monteiro y Cunningham, 2012). Como se ha indicado anteriormente, para la biorremediación por bioacumulación los organismos empleados deben estar vivos y por lo tanto tienen que ser capaces de sobrevivir a las concentraciones de metales y a los pHs de las soluciones a biorremediar.

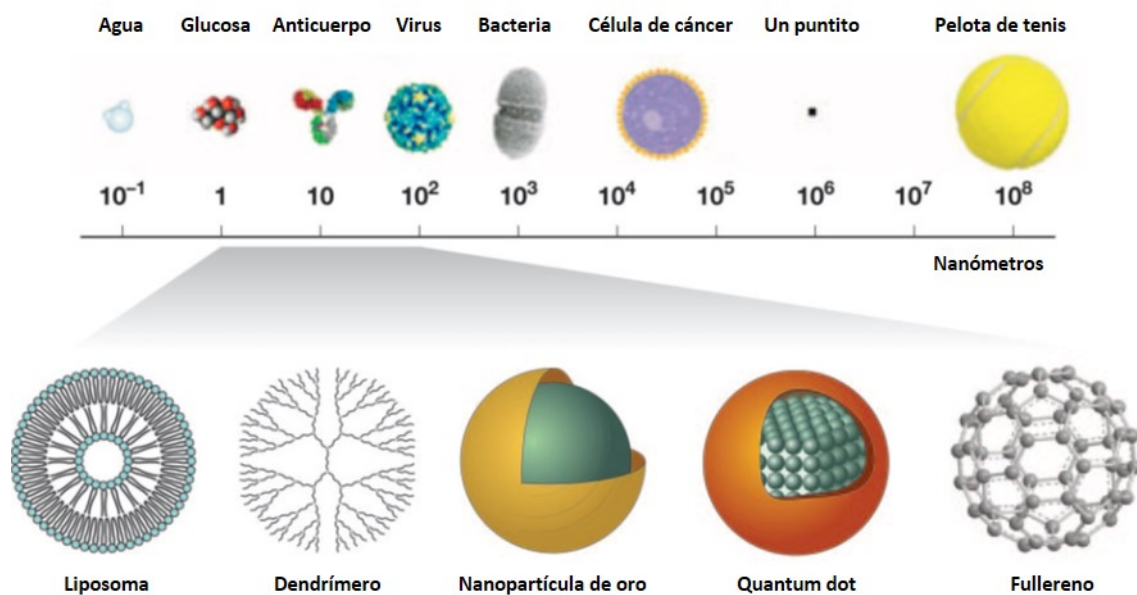
La tolerancia a metales se puede describir como la capacidad de un organismo de responder frente a un medio que le es adverso debido a las concentraciones metálicas presentes. Se conocen microalgas que en estas condiciones han desarrollado mecanismos de adaptación frente a un determinado contaminante después de haber sido expuestas al mismo Stockner (1976) y Wang (1987) describieron la capacidad de ciertos organismos de resistir la presencia de elevadas concentraciones de un metal si previamente había sido aclimatado gradualmente al mismo (Stockner y Antia, 1976; Wang, 1987). De esta forma una cepa de *Chlorella vulgaris*, que de forma constante fue cultivada en presencia de Cu, desarrolló tolerancia a este metal y mostró la capacidad de crecer en medios con altas concentraciones del mismo. Los mecanismos de tolerancia a metales son muy complejos. En ellos pueden estar implicadas proteínas tales como las metalotioneínas o las fitoquelatinas, pero la tolerancia también se puede dar mediante la exclusión del metal de la célula gracias a un transporte selectivo del mismo o dando lugar a su compartimentalización en vacuolas o incluso en ciertos orgánulos como mitocondrias o cloroplastos, para facilitar la neutralización de sus potenciales efectos tóxicos. Esta última estrategia sería la utilizada preferentemente por las microalgas, originando así a la vez la acumulación del metal (Gharieb y Gadd, 2004; Arunakumara y Zhang, 2008).

1.2.2 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS (NPs)

La Nanotecnología es el uso de materiales extremadamente pequeños, 1- 100 nm, que poseen propiedades físico-químicas únicas debido a su tamaño (Fig. 1). Constituye uno de los campos de investigación más activos dentro de lo que es la actual ciencia de los materiales. Existe una gran diversidad de materiales nanoestructurados tales como nanopartículas (NPs), nanoporos, nanotubos, etc., siendo las NPs el pilar fundamental de la nanotecnología. El rango de aplicaciones es prácticamente infinito en ciencias tan diferentes como Física, Química, Electrónica, Óptica, Ciencia de materiales, Ciencias biomédicas, Farmacología o Ciencias ambientales, entre otras (Fig. 2).

Las NPs pueden ser de distinta naturaleza, desde las formadas por polímeros o distintas sustancias orgánicas hasta las formadas por metales constituidas por los propios metales en estado elemental como las de Ag, Au, Cu, Pd y Pt entre otros, o en forma de óxidos como Fe_3O_4 , UO_2 , SiO_2 , ZnO , TiO_2 , etc. o sulfuros Ag_2S , Fe_3S_4 , CdS , ZnS , etc., o incluso en aleaciones de varios metales como Ag-Au, Au-Ag-Cu (Khan y col., 2012; Rajamanickam y col., 2012; Sommaruga y col., 2014; Suriyaraj y col., 2014; Ding y col., 2015; Sowjanya, 2015; Stark y col., 2015).

Figura 1. Representación del rango de tamaños de nanomateriales (modificado de McNeil, 2005).

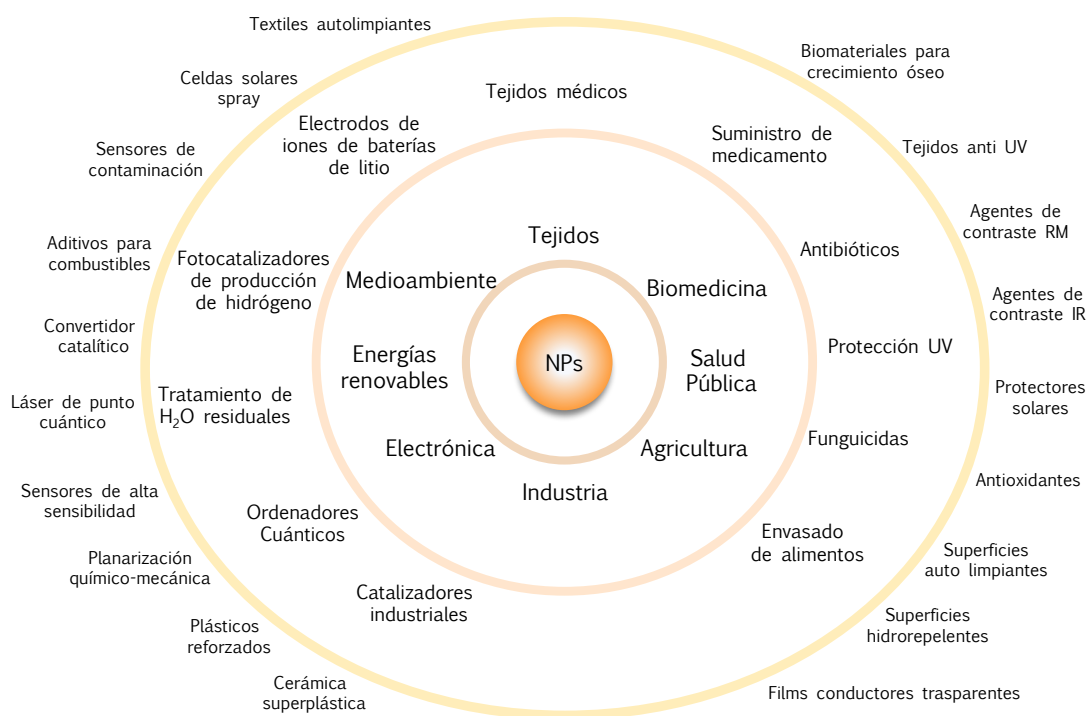


Tradicionalmente la forma de producir NP se realiza mediante procesos **físicos** que requieren de metodologías caras con un alto gasto energético o **químicos** que requiere del uso de agentes reductores y estabilizantes que son caros, altamente peligrosos, contaminantes y no biodegradables (Sotiriou y Pratsinis, 2010; Sotiriou y col., 2011; de Sanctis, 2013; Tran y Le, 2013; Zhang y col., 2013a). Existe la idea de que estos métodos son capaces de controlar el tamaño y la forma de las NPs, características que son muy relevantes para su actividad, sin embargo este tipo de control no siempre se alcanza (Javani y col., 2015).

La cada vez mayor demanda de NPs en la industria ha creado la necesidad de buscar métodos más seguros, baratos y ecológicos de producción. En los últimos años se ha asistido a una verdadera revolución con la síntesis **biológica** de nanopartículas en lo que se ha denominado la **síntesis verde**, que conecta la nanotecnología y la biotecnología, encontrándose como se puede ver en la literatura de este campo. La síntesis verde utiliza tanto compuestos biocompatibles como extractos biológicos, principalmente de plantas, u organismos como algas, hongos y principalmente bacterias. Los microorganismos se han utilizado para la producción de NPs intracelular o extracelularmente (a partir de sus caldos de cultivo). Esta última ha sido la más empleada (Mandal y col., 2006; Alani y col., 2012; Sunkar y Nachiyar, 2012; Kharissova

y col., 2013; Quester y col., 2013; Javani y col., 2015; Ortega y col., 2015; Beeler y Singh, 2016; Shankar y col., 2016). Aunque se han utilizado microalgas para la producción de NPs, son muy pocos los casos descritos, por ejemplo, se han usado *Chlorella vulgaris* y *Tetraselmis kochinensis* para la síntesis de AuNPs, y *Chlamydomonas reinhardtii* para AgNPs (Shankar y col., 2016).

Figura 2. Diferentes campos de aplicación de las nanopartículas; modificado de (Sowjanya, 2015).



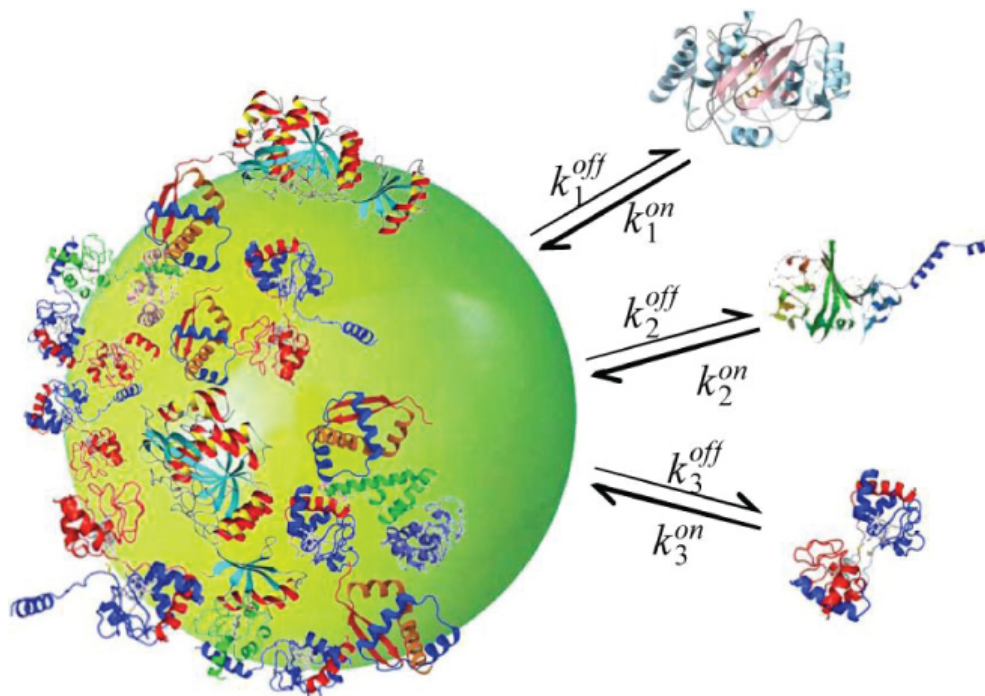
1.2.2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

La plata fue uno de los primeros metales empleados en medicina debido a sus propiedades antimicrobianas. Los griegos, romanos y fenicios utilizaban recipientes de plata para el almacenamiento de comida y agua, permitiendo que permanecieran en buen estado durante periodos prolongados de tiempo y evitar de esta forma el riesgo de infecciones. El uso de utensilios de cocina como cubiertos o teteras de plata es aún una costumbre común en algunas comunidades que se ha mantenido hasta hoy en día (Alexander, 2009). Actualmente el uso de compuestos de plata o plata coloidal es aún utilizado en algunas prácticas médicas. La forma en la que este metal es más utilizado es la de nitrato de plata, que se aplica para la prevención y el tratamiento de conjuntivitis en recién nacidos, para evitar riesgos de infecciones en quemados graves, para cubrir catéteres, para reducir riesgos de infecciones oportunistas en unidades de cuidados intensivos, o en forma coloidal en apósitos para el tratamiento de heridas de difícil curación (Klasen, 2000). Aunque los mecanismos de acción de las AgNPs no están claros se han descrito rutas posibles para su actividad antimicrobiana como su unión a las paredes celulares incrementando su permeabilidad provocando un desbalance osmótico y un transporte incontrolado a través de la membrana

citoplasmática, lo que causa la muerte de la bacteria (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Morones y col., 2005). Otro posible mecanismo es el daño directo causado por las pequeñas AgNPs que pueden penetrar la pared celular e inhibir la replicación del DNA (El-Deeb y col., 2013). Uno de los mecanismos antimicrobianos mejor conocidos está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como O_2 , H_2O_2 , OH^\cdot y NO dada la facilidad del oxígeno para reducirse (Schmitt y col., 2014; Mamonova y col., 2015). Estas especies son muy reactivas y pueden actuar sobre diferentes moléculas tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Lyras y col., 1998; Cadet y col., 2010). La utilización de AgNPs como antimicrobianos se ha propuesto como una posible solución al incremento de la resistencia a antibióticos de los microorganismos. Esta propuesta, aunque no aplicable a todos los casos, se basa en que los mecanismos que se han propuesto para su actividad y que se han descrito anteriormente, no implican una diana de actuación específica en la bacteria que pueda modificarse y promover de esta forma la resistencia. El espectro de acción de las AgNPs que se conoce incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas sean cepas resistentes o no a los antibióticos, hongos y virus, aunque su utilización en clínica puede estar limitada por su nivel de toxicidad (Sharma y col., 2009; Javani y col., 2015; Beeler y Singh, 2016). A parte de las propiedades antibacterianas que permiten utilizar las AgNPs en medicina, estos nanomateriales poseen también propiedades ópticas, eléctricas y térmicas que les permiten ser utilizadas en otros campos. Estas propiedades se deben principalmente a las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción (plasmón) asociados a la superficie de los metales al ser iluminados a una longitud de onda apropiada que concentra el campo eléctrico de la luz en el entorno de la NP. Cuando la luz interacciona con las partículas excita la superficie del plasmón causando una oscilación de la banda de electrones conocida como resonancia del plasmón de superficie (SPR). Este efecto se observa en la región visible del espectro y depende de la composición, tamaño, y forma de las partículas, así como del entorno dieléctrico en el que se encuentren. Las AgNPs son capaces de absorber y dispersar la luz mejor que cualquier otro tipo de NPS, lo que las convierte en uno de los nanomateriales más interesantes desde el punto de vista de aplicaciones ópticas e incluso energéticas para la captación de la energía solar (Yun y col., 2013). Otra aplicación de la AgNPs también basada en la existencia de la SPR es la detección y cuantificación de diversas sustancias orgánicas o iones metálicos por la variación que la proximidad de estos genera en el plasmón de resonancia (Vilela y col., 2012; Zamborini y col., 2012; Liu y Chen, 2013; Manivel y Ilanchelian, 2017). Un aspecto derivado del tamaño de los nanomateriales es que tienen una alta relación superficie/volumen lo que les hace tener propiedades muy diferentes de partículas de mayor tamaño, entre ellas las que puedan utilizarse como catalizadores en algunos procesos, como por ejemplo, la degradación de colorantes por métodos químicos o fotoquímicos (Campelo y col., 2009; Vidhu y Philip, 2014). Aunque las propiedades y las aplicaciones de las AgNPs dependen de factores tales como su tamaño y la dispersión de tamaños en una determinada preparación, su forma y la estabilidad que presentan en las condiciones de uso, todos estos factores pueden verse afectados por los métodos de preparación y por los componentes que finalmente

recubren el **core** metálico, ya que esta **corona** puede afectar a la interacción de las NPs con otras sustancias o con células o a su mecanismo de acción (Fig. 3).

Figura 3. Esquema de formación de la corona de una nanopartícula metálica. Distintos componentes proteícos o no proteícos interaccionan con el **core** metálico originado por reducción de los iones metálicos en solución (Sahneh y col., 2013).



La utilización de sistemas biológicos para la producción de AgNPs, permite disponer de toda la diversidad biológica a partir de la cual se pueden obtener extractos biológicos, caldos de cultivo, y componentes químicos diversos, de tal forma que estos puedan dar lugar a la formación de AgNPs con distintas propiedades, quizás utilizables para aplicaciones aún desconocidas (Javani y col., 2015).

1.3 EL RÍO TINTO

El río Tinto nace en Peña de Hierro de diversos manantiales ácidos y desemboca en el Océano Atlántico formando junto con el Río Odiel, un estuario conocido como la Ría de Huelva (Fig. 4). El río Tinto está sujeto a un régimen hidrológico de tipo estacional (mediterráneo) lo que hace que su caudal varíe dependiendo de las estaciones (Gonzalez-Toril y col., 2003a). A pesar de ello mantiene el pH, que se conserva casi constante ($\approx 2,3$), y con elevadas concentraciones de Fe^{3+} y metales pesados a lo largo de todo su curso hasta llegar al inicio de su estuario, donde sus aguas se mezclan con las del Océano Atlántico constituyendo la ría de Huelva. Durante las últimas décadas la zona considerada puramente río, que va desde el nacimiento en Peña de Hierro hasta La Palma del Condado, ha sido objeto de un profundo estudio desde diferentes puntos de vista incluida la Ecología Microbiana.

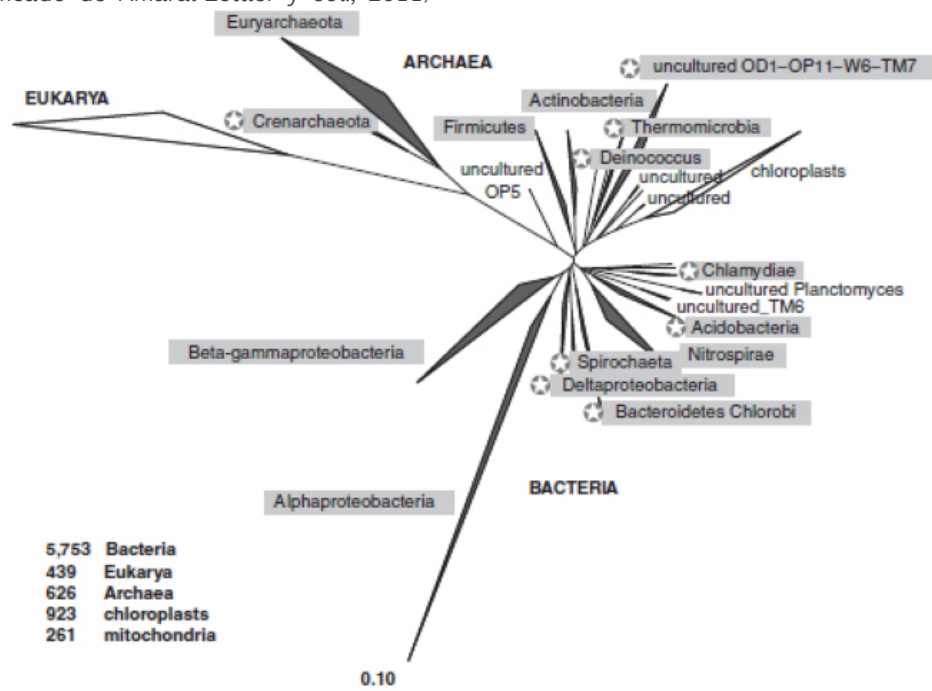
The map illustrates the Huelva region, bordered by Portugal to the west, Guadiana and Extremadura to the north, and Andalucía to the east. The Guadiana River is a central feature, with numerous tributaries such as the Río de Matalagorda, Río Cábica, Río de Sancho, Río de Beas, Río de Guadalejo, Río de Tinto, and Río de Guadalejo. The map shows the county limit (blue dotted line), the fluvial network (blue lines), the location of the embalse in explotación (blue dam symbol), the frontier limit (black line with crosses), and the provincial limit (dashed line). Key locations include Huelva, Beas, Valverde del Camino, Sillos, Peralillo, Odiel, Aracena, Chanza, Piedras, Los Machos, Tierra, Ayamonte, Isla Cristina, and La Palma del Condado. A scale bar indicates distances up to 20 km, and UTM coordinates are provided for the 700,000 zone.

Utilizando diferentes técnicas de microbiología clásica y molecular, se ha observado una baja diversidad procariótica (Fig. 5). Esta se encuentra principalmente en las zonas óxicas, mientras que en las zonas anóxicas la diversidad es mayor (García-Moyano y col., 2012). Por el contrario, la diversidad eucariótica presente en el río Tinto es muy elevada. Los protistas fotosintéticos conforman una parte importante de la biomasa del ecosistema del Tinto (65%). Miembros de los grupos Bacillariophyceae (Diatomeas), Euglenozoa (Euglena), Chlorophyta (*Clamydomonas*, *Chlorella*, *Klebsormidium* y *Zignema*), y Rhodophyta (*Galdieria*) han sido identificadas y algunas de ellas aisladas y caracterizadas (López-Archilla y col., 1993; Amaral Zettler y col., 2003; Aguilera y Amils, 2005). Asociados a las biopelículas que se desarrollan en la superficie de las rocas existe una importante diversidad de hongos acidófilos (como los hongos negros (Demateaceos) que parecen ser específicos de ambientes ácidos extremos), levaduras y hongos filamentosos (López-Archilla y col., 2001; Amils y col., 2002; Gonzalez-Toril y col., 2003b; López-Archilla y col., 2004; Amaral Zettler y col., 2011). De entre los

16

eucariotas los protistas heterótrofos constituyen el grupo más importante de consumidores del ecosistema encontrándose distintos flagelados, ciliados (filo *Ciliophora*), amebas de la clase Lobosea (phylum Rhizopoda) y representantes de la clase Heliozoa (filo *Actinopoda*) asociados generalmente a biopelículas (López-Archilla y col., 2001; Amaral Zettler y col., 2002; Aguilera y col., 2007a).

Figura 5. Estructura de la comunidad microbiana del río Tinto. (Modificado de Amaral-Zettler y col., 2011)



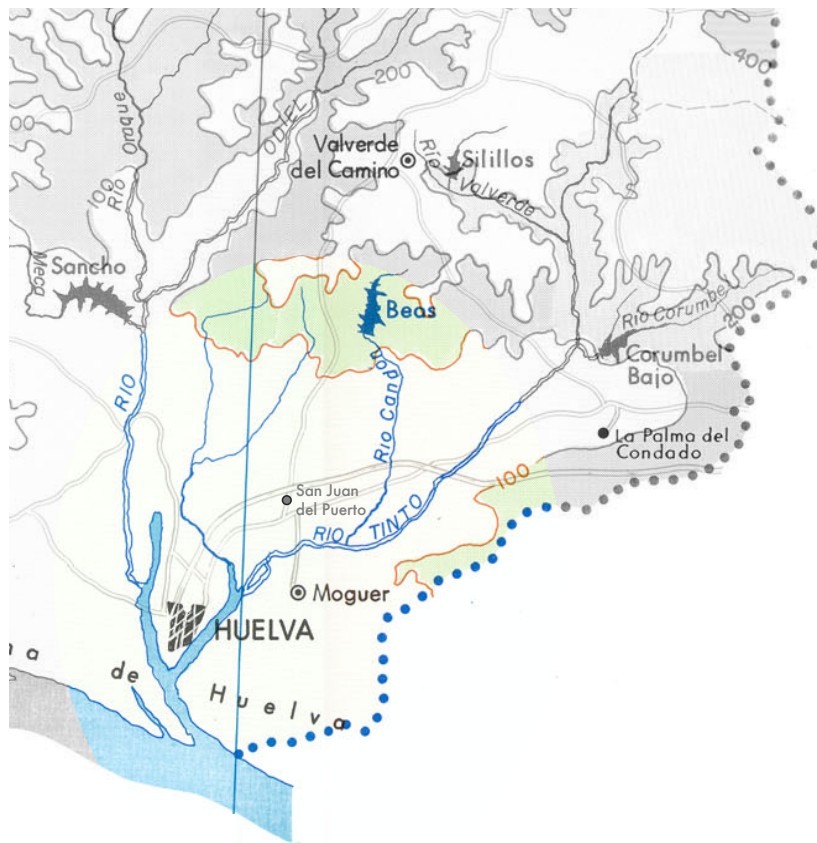
Los microorganismos quimiolitóautótrofos, junto con los protistas fotosintéticos son los productores primarios del ecosistema. Los quimiolitótrofos oxidadores de hierro tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp., *Acidiphilium* sp. y *Ferroplasma* spp. se han aislado e identificado de forma recurrente en distintas estaciones de muestreo a lo largo del río, siendo los dos primeros los mayoritarios en el sistema, mientras que las arqueas del género *Ferroplasma* se encuentran confinadas en la zona más extrema cercana al origen (Amils y col., 2002; Gonzalez-Toril y col., 2003b). *At. ferrooxidans*, capaz de oxidar hierro y compuestos reducidos de azufre, es el más cosmopolita encontrándose no solo en las aguas sino también en zonas anóxicas, lo que posiblemente está relacionado con su capacidad de respirar anaeróbicamente compuestos reducidos de azufre utilizando ion férrico como aceptor de electrones (López-Archilla y col., 2001; Amils y col., 2002; Gonzalez-Toril y col., 2003a). Es llamativo que precisamente en estas zonas anóxicas se hayan encontrado grupos de bacterias y arqueas no encontrados en la parte acuática, o al menos no en porcentajes importantes, tales como alfa-proteobacterias (*Acidiphilium*, *Acidocella*, *Acidisphaera*), beta-proteobacterias (orden *Nitrosomonadales*, '*Ferroplasma myxofaciens*'), gamma-proteobacterias (bacteria WJ2), acidobacterias, firmicutes, actinobacterias y *Thermoplasma* (García-Moyano y col., 2012; Sánchez-Andrea y col., 2012). Algunas

bacterias estrictamente anaerobias Gram positivas reductoras del hierro relacionadas con los géneros *Ferrimicrobium* y *Acidimicrobium* se han aislado e identificado en las zonas de inundación oceánica de las marismas, dónde generan precipitados negruzcos debidos a la formación de sulfuros de hierro y de otros metales presentes en el sistema. En estas zonas sí que se producen variaciones del pH, que fluctúa dos veces al día debido a la llegada de agua de mar con la marea alta (Gonzalez-Toril y col., 2003b).

1.3.1 ESTUARIO DEL TINTO

La zona intermareal o estuario del Tinto es un sistema ambiental dónde se unen las aguas saladas del Océano, sujetas a la acción de las mareas, junto con las ácidas del río (Fig. 6). La zona de mezclas, constituye un ambiente complejo y dinámico de gradientes longitudinales de parámetros físico-químicos como pueden ser la salinidad, el pH o la temperatura que ocurren en este tipo de zonas intermareales (Lebreton y col., 2011).

Figura 6. Estuario del río Tinto. Imagen modificada de chguadiana.es



(MAPAMA), en color, el estuario del río Tinto.

Cuando la marea es alta, el agua salada sube hacia el río reteniendo la bajada de sus aguas. El agua marina, al encontrarse con las aguas del río, genera una mezcla con una salinidad reducida, por lo que este parámetro se suele utilizar como elemento traza de las mezclas de masas de agua. Por otro lado, debido a la diferencia de las

propiedades hidroquímicas del agua entre las aguas saladas y ácidas, se producen cambios en muchos elementos metálicos transportados por las aguas del río como Zn, Cu, Cd y Co, que a bajo pH se encuentran en disolución y que pueden estar sujetos a procesos de precipitación y co-precipitación (Braungardt y col., 2003; Stedmon y Markager, 2005; Nieto y col., 2013).

Estos fenómenos generan un ambiente con características físico-químicas cambiantes que pueden afectar a la microbiota presente. Esta región es una de las zonas del río Tinto que aún no ha sido explorada. En el presente trabajo abordamos por primera vez el estudio de la diversidad bacteriana presente en las aguas superficiales de este ambiente.

2 OBJETIVOS

Este estudio ha tenido dos objetivos principales: por un lado, la caracterización de la diversidad microbiana presente en la región intermareal del río Tinto utilizando técnicas moleculares y por otro el aislamiento de algunos de estos microorganismos y la caracterización de sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

Los objetivos específicos fueron:

- Analizar las condiciones físico-químicas de las aguas del río Tinto desde La Palma del Condado hasta La Rábida para determinar la zona intermareal.
- Caracterizar mediante técnicas de clonación, la diversidad microbiana presente en la zona intermareal a lo largo de un año y en alta y en baja marea. Comparación de esta diversidad con la encontrada en las regiones anterior y posterior a la intermareal.
- Aislar microalgas de la zona de estudio, caracterizarlas morfológicamente mediante microscopía óptica y analizarlas filogenéticamente mediante el análisis del gen del 18S rRNA.
- Estudiar dos posibles aplicaciones biotecnológicas de las microalgas aisladas tales como su tolerancia a metales para su posible utilización en biorremediación y su capacidad de síntesis de nanopartículas de plata con actividad antibacteriana.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS UTILIZADOS

Se indica en la tabla 3 el listado de los reactivos utilizados y su casa comercial.

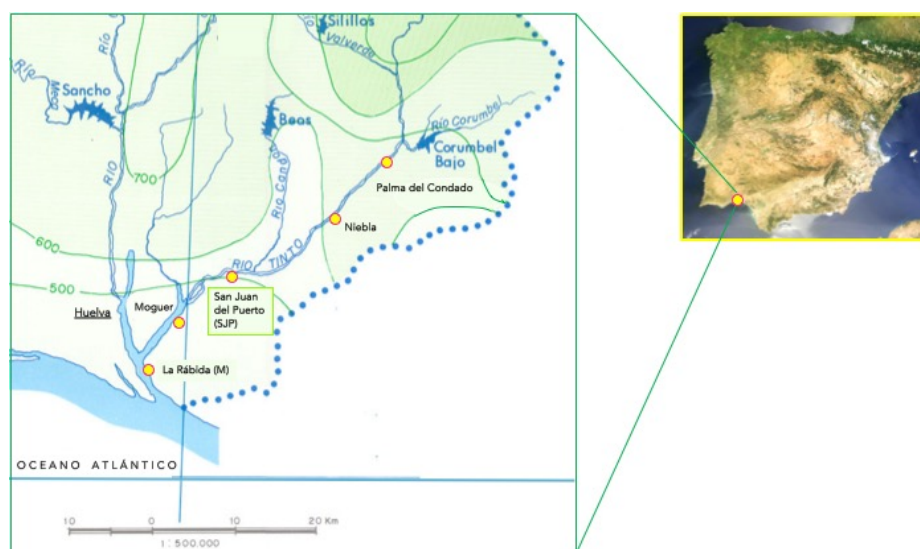
Tabla 3. Reactivos utilizados y casa comercial correspondiente

Reactivo	Casa comercial
ϕ 29-HindIII DNA	CBMSO
5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal)	SIGMA-ALDRICH
Ácido cítrico	MERCK
Ácido clorhídrico	MERCK
Agar Bacteriológico	MERCK
Agarosa	SIGMA-ALDRICH
AgNO ₃	MERCK
Agua de mar artificial	TROPIC MARIN
Ampicilina	ROCHE
Bromuro de etidio	SIGMA-ALDRICH
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH
Cebadores	SIGMA-ALDRICH
DNTPs	INVITROGEN
Etanol	MERCK
Extracto de carne	LABORATORIOS CONDA
Extracto de levadura	LABORATORIOS CONDA
H ₂ SO ₄	MERCK
Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)	SIGMA-ALDRICH
Lisozima	FLUKA
Metanol	MERCK
MgCl ₂ 25 mM (PCR)	ROCHE
MgSO ₄	SIGMA-ALDRICH
Peptona bacteriológica	LABORATORIOS CONDA
pGEM®-T Easy Vector System	PROMEGA
Polietilenglicol 6.000	MERCK
PowerPlant DNA isolation kit	MO BIO
Proteinasa K	SIGMA
Sales utilizadas para los medios	MERCK
Tampón fosfato salino (PBS)	CBMSO
Taq DNA polimerasa	ROCHE
Titriplex III (EDTA)	MERCK
Triptona	MERCK
Tris base	SIGMA-ALDRICH

3.2 RECOGIDA DE MUESTRAS







Se recolectaron cinco muestras correspondientes a la Palma del Condado (PC), Niebla (N), San Juan del Puerto (SJP), Moguer (M) y La Rábida (RAB) (Fig. 7) en abril del 2011 en marea baja (MB) y en marea alta (MA). Se eligieron los días y las horas de mareas máximas y mínimas del mes, con semiperiodo de marea de unas 6,3 h de media. Los horarios de muestreo se establecieron teniendo en cuenta las tablas de mareas, dividiendo el ciclo mareal como lo propone (Kjerfve, 1990). Se midieron *in situ* pH, temperatura, salinidad y conductividad con una sonda multiparamétrica modelo YSI 556MPS (YSI Environment). La composición elemental de las muestras se analizó mediante Fluorescencia de Rayos X por Reflexión-Total (TXRF) en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Figura 7. Posición de los puntos de muestreo desde La Palma del Condado hasta la Rábida. Imágenes modificadas de Google maps y de chguadiana.es (MAPAMA)








Posteriormente se efectuaron muestreos en San Juan del Puerto y La Rábida durante los años 2011 y 2012, una vez por cada estación del año (19 julio 2011, 25 octubre 2011, 11 marzo 2012 y 17 mayo 2012). Adicionalmente se efectuó un muestreo el 26 de junio de 2012, en el que la diferencia del semiperiodo entre marea alta y marea baja fue mínima (3 h). Las muestras se denominaron de la siguiente forma:

- PRIM_SJP_MB - San Juan del Puerto, primavera marea baja
- PRIM_SJP_MA - San Juan del Puerto, primavera marea alta
- VER_SJP_MB - San Juan del Puerto, verano marea baja
- VER_SJP_MA - San Juan del Puerto, verano marea alta
- OTO_SJP_MB - San Juan del Puerto, otoño marea baja
- OTO_SJP_MA - San Juan del Puerto, otoño marea alta
- INV_SJP_MB - San Juan del Puerto, invierno marea baja
- INV_SJP_MA - San Juan del Puerto, invierno marea alta

-  **SJP_MM** - San Juan del Puerto: muestra sin diferencia entre marea alta y baja
-  **PRIM_RAB** - La Rábida, primavera
-  **VER_RAB** - La Rábida, verano
-  **OTO_RAB** - La Rábida, otoño
-  **INV_RAB** - La Rábida, invierno
-  **RAB_MM** - La Rábida, muestra sin diferencia entre marea alta y marea baja

Las muestras de agua fueron recogidas directamente en botellas estériles de 2 L y conservadas a 4°C hasta su procesamiento posterior tanto para extracción de DNA total como para el aislamiento de microorganismos mediante cultivos de enriquecimiento. Las medidas *in situ*, así como el análisis de la composición elemental de las muestras por TXRF, se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente.

3.3 MEDIOS DE CULTIVO

-  **Medio Nutritivo:** (Lapage y col., 1970), peptona 5 g L⁻¹; extracto de carne 3 g L⁻¹; NaCl 8 g L⁻¹.
-  **LB-ampicilina:** (Lennox, 1955), triptona 10 g L⁻¹; extracto de levadura 5 g L⁻¹; NaCl 5 g L⁻¹; ampicilina 100 µg mL⁻¹ añadida al medio LB estéril cuando la temperatura se encontró a 50 °C.
Para los medios Nutritivo y LB-ampicilina sólidos se añadió agar bacteriológico al 1,5%.
-  **Medio SOC:** (Promega Corporation, 2015) Para 100 mL: 2 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl (1 M) y 0,25 mL de KCl (1 M).
-  **Medio BG-11:** (Allen, 1968). Para 1 L: 1,5 g de NaNO₃; 0,02 g de Na₂CO₃; 0,0272 g de CaCl₂; 0,0524 g de K₂HPO₄·3 H₂O; 0,075 g de MgSO₄·7H₂O; 0,006 g de ácido cítrico; 0,001 g de EDTA; 1 mL de citrato de amonio férrico (60 mg mL⁻¹); 1 mL⁻¹ de micronutrientes⁴.
-  **Medio L1** (sin silicatos): (Guillard y Hargraves, 1993). Fue preparado con agua de mar artificial (Tropic Marin) según lo descrito por Guillard & Hargraves (1993). Todos los medios menos el L1 se esterizaron a 121 °C a 1 atm de sobrepresión durante 20 min. El medio L1 se esterilizó por filtración.

3.4 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA

3.4.1 CEBADORES UTILIZADOS

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron los que se especifican en la tabla 4.

⁴ H₃BO₃ 2,86·10⁻³g L⁻¹, MnCl₂·4H₂O 1,81·10⁻³g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0,222·10⁻³g L⁻¹, Na₂MoO₄ 0,39·10⁻³g L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0,079·10⁻³g L⁻¹, Co(NO₃)₂·6H₂O 0,0494·10⁻³g L⁻¹.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA y del gen 18S rRNA respectivamente para los dominios *Bacteria* y *Eukarya*, y para la amplificación del gen ribosomal inserto en el vector de clonación. Las letras F (*forward*) y R (*reverse*) indican la orientación del cebador con respecto al rDNA.

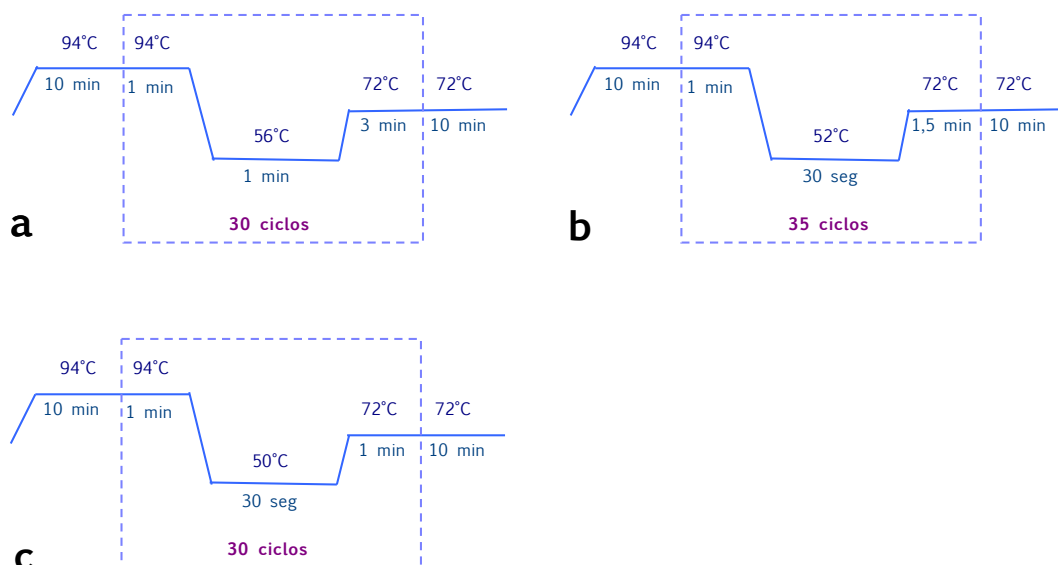
Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>Bacteria</i>		
27f	AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG	(Goodfellow y Stackebrandt, 1991)
1492r	TAC GG(CT) TAC CTT GTT ACG ACT T	
<i>Eukarya</i>		
18Scomr1	CAC CTA CGGAMAACCTTGTTACGAC	(Zhang y col., 2005)
18Scomf1	CGT TGT CTA AAG ATT AAG CCA TGC	
pGEM-T		
SP6f	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	(Promega Corporation, 2015)
T7r	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	

3.4.2 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S rRNA

Para el estudio de la diversidad bacteriana en las zonas de estudio, se filtraron 200 mL de cada una de las muestras a través de una membrana de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, MERK). Las células retenidas en los filtros provenientes de muestras recogidas durante la marea alta se lavaron con 2 volúmenes de tampón fosfato salino (PBS) (1x: NaCl 8 g L⁻¹, KCl 0,2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ · 2H₂O 1,44 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0,24 g L⁻¹, pH 7,4) y las de marea baja con 2 volúmenes de agua destilada ácida (ajustada a pH 1.5 con H₂SO₄) para eliminar el exceso de sales y eventuales metales pesados. La extracción del DNA se llevó a cabo mediante utilización del kit PowerSoil DNA isolation kit (MOBIO) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El DNA genómico extraído se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La amplificación mediante PCR del 16S rDNA se llevó a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, EEUU). Las mezclas de reacción contenían en 50 µL de volumen final: 3 µL de la preparación de DNA (20-60 ng), 1X tampón de PCR, 1 mM (c/u) dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA Polimerasa y 0,5 µM de cada cebador 27f y 1492r (tabla 4). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las especificadas en la figura 8. Los productos de las extracciones de DNA y de los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), teñidos con bromuro de etidio (10 µg mL⁻¹) y visualizados con lámpara de UV.

Figura 8. Condiciones de PCR para la amplificación del: a) 16S rDNA con cebadores 27f y 1492r; b) 18S rDNA con cebadores 18comf1 y 18comr1; c) Inserto clonado en pGEM-T con cebadores SP6 y T7.



3.4.3 CLONACIÓN DE LOS AMPLICONES DE 16S rDNA

Los productos de PCR se ligaron al vector pGEM-T del kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante y se transformaron en células DH5- α competentes procedentes del Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO).

Las colonias blancas obtenidas se replicaron en una placa maestra de medio LB-ampicilina con X-gal e IPTG para confirmar la presencia del inserto. A partir de las colonias repicadas se lisaron las células bacterianas hirviendo las suspensiones en agua destilada esteril durante 10 min. El DNA clonado se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores SP6 y T7 (Tab. 4), utilizando mezclas de reacción de 50 μ L conteniendo de 0,5 μ L de la preparación de DNA, 1X tampón de PCR, 0,5 mM dNTPs, 3 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada uno de los cebadores y 1,25 U de Taq DNA Polimerasa. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las indicadas en la figura 8.

3.4.4 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN

Previamente a la secuenciación, los productos de amplificación fueron purificados mediante el uso de polietilenglicol siguiendo el protocolo descrito a continuación. A cada reacción de PCR se añadió igual volumen de una solución de purificación (Polietilenglicol 6.000 al 20% en NaCl 2,5 M) y la mezcla fue incubada 30 min a 37 °C con agitación cada 10 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a una velocidad de 14.000 rpm en una microcentrífuga (Mikro 120 Hettich) y el sedimento se lavó dos veces con etanol al 80% frío, con centrifugaciones de 15 min a la misma velocidad. El sedimento se secó finalmente al vacío en un Concentrator Plus (Eppendorf)






y se resuspendió en 20 µL de agua MilliQ estéril. La concentración del DNA se midió en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron ajustadas a las concentraciones requeridas para su secuenciación, que fue realizada por MacroGen Europe (Holanda).

3.4.5 ENSAMBLAJE Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa DNABaser (versión DNA Sequence Assembler v4 2013), Heracle BioSoft). Las secuencias completas se compararon con las existentes en GenBank con el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990) en el servidor web del Nacional Center For Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos SILVA (Quast y col., 2012). Los alineamientos de las secuencias y la construcción de los árboles se realizaron con ClustalX version 2.1 (Thompson y col., 1997; Larkin y col., 2007). Para la construcción de los árboles se utilizó el método de *Neighbour-joining* con un bootstrap de 1000 réplicas.

3.4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando tres programas informáticos: SPSS (versión 21.0, IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.), CANOCO (versión 5.0, Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA) y GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software, La Jolla California USA). Se realizó un ANOVA (Analysis of Variance) bidireccional con comparación múltiple asociada a un test *post hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$) para analizar los resultados relativos a las curvas de crecimiento (de microalgas y de bacterias) y discriminar las muestras con diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Fisher, 1925; Bonferroni, 1936), de acuerdo a la simbología:

-  ns = $p > 0,05$
-  * = $p \leq 0,05$
-  ** = $p \leq 0,01$
-  *** = $p \leq 0,001$
-  **** = $p \leq 0,0001$

Partiendo de las mediciones *in situ* de los parámetros físico-químicos y del análisis elemental obtenido por TXRF con los programas SPSS y CANOCO se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) en las muestras PC, N, SJP_MA, SJP_MB, M y RAB (pH, conductividad, salinidad, potencial redox, O₂, Al, As, Br, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mn, Ni, P, S, Si, Sr, Ti, Zn) y sucesivamente en SJP y RAB en todos los muestreos realizados (pH, conductividad, salinidad, potencial redox, O₂, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mn, S, Sr, Zn) (Wold y col., 1987). A través del Análisis de Correspondencia sin tendencia (DCA), realizada con el programa CANOCO, se integraron las mediciones físico-químicas con los resultados del estudio de la diversidad biológica para observar la relación entre éstas

y los posibles cambios en la comunidad microbiana en condiciones de marea alta y baja y en las diferentes estaciones del año (Lepš y Šmilauer, 2003) en las muestras SJP.

Las matrices finales fueron, en resumen:

- 6 muestras x 21 variables físico-químicas (PCA)
- 14 muestras x 14 variables físico-químicas (PCA)
- 9 muestras x 14 variables x 47 OTUs (DCA)

3.4.6.1 ÍNDICES DE DIVERSIDAD

La riqueza es un parámetro importante a tener en cuenta en la determinación de la diversidad en una comunidad biológica. En este estudio se analizó la diversidad α a través de las curvas de rarefacción con el programa Analytic Rarefaction, (versión 2.2 Hunt Mountain Software) y el índice de Shannon-Wiener (H) (Shannon y Weaver, 1948) de acuerdo a la fórmula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

donde la variable “ p_i ” representa la proporción de la abundancia relativa de la especie “ i ” en relación a la abundancia de todas las especies (S) detectadas en el muestreo. El valor mínimo puede aproximarse al cero y el valor máximo, no está consolidado a un límite. Los índices de diversidad- α siempre se reportan en conjunto con análisis de riqueza y equitatividad de especies detectadas en un muestreo. En este trabajo se utilizó para calcular la equitatividad de especies (J) la fórmula:

$$J \approx \frac{H}{\ln S}$$

donde la variable “H” es el índice de Shannon-Wiener y la variable “S” es la riqueza de especies detectadas durante el muestreo. El valor (J) de la equitatividad de especies varía entre los valores “0” y “1”; donde el valor “0” representa baja equitatividad (o alta dominancia por pocas especies) y el valor “1” representa total equitatividad en la representación de individuos de cada especie detectada en el muestreo (Shannon y Weaver, 1948). La diversidad β , de acuerdo a Whittaker (Whittaker y col., 2001) describe las diferencias entre muestras basándose en la composición de los taxones y su abundancia relativa. En este estudio se calculó a través de la fórmula:

$$\beta = (S_1 - c) + (S_2 - c)$$

donde “S” representa la riqueza de especies en dicha comunidad y “c” representa la riqueza de especies compartidas entre las comunidades.

3.5 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS AISLADOS MICROALGALES

3.5.1 AISLAMIENTO DE MICROALGAS

El aislamiento de microalgas se realizó a partir del muestreo de primavera realizado en mayo del 2012 en San Juan del Puerto, periodo en el que la observación microscópica de las muestras mostró una mayor abundancia de microalgas. Los aislamientos se llevaron a cabo utilizando dos tipos de metodologías:

3.5.1.1 AISLAMIENTO MEDIANTE ESTRÍAS EN PLACA

5 mL de las muestras de agua conservadas a 4 °C fueron centrifugados 5 min a 6000 rpm en una microcentrífuga (Hettich Mikro 120) para enriquecer en células eucarióticas. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 1,5 mL de medio BG 11 o L1.

Se extendieron 100 µL de estas preparaciones sobre placas de Petri con medio BG-11 a pH 7 o pH 4 que fueron incubadas a 20 °C con un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad) y con una intensidad de irradiación de 60 µmol m⁻²s⁻¹.

Una vez se observó crecimiento en forma de colonias de diferentes morfologías y colores, se realizó un reaislamiento pasando cada colonia independiente a nuevas placas de igual composición haciendo una estría y se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento que las placas originales (Rosowski y Hoshaw, 1970; Andersen, 2005).

A partir de los aislados en placa se llevaron a cabo cultivos en medio líquido (BG11 y L1) utilizando placas Falcon® de 24 o de 6 pocillos y bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que los utilizados anteriormente hasta observar crecimiento. Éste se siguió mediante observación microscópica óptica en campo claro (Axiovert 200, Zeiss) diariamente utilizando objetivos con aumentos de 20X y 40X, lo que permitió, además, controlar que el cultivo estaba formado por un único tipo de microalga.

3.5.1.2 AISLAMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO MEDIANTE DILUCIONES SERIADAS

Las muestras naturales se enriquecieron durante 15 días en medios líquidos BG 11 a pH 7 o 4 y medio L1 con un fotoperiodo de 16:8h (luz:oscuridad) y una intensidad de irradiación de 60 µmol m⁻²s⁻¹. A partir de los cultivos de enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas de los cultivos en los mismos medios utilizando placas de 24 pocillos.

3.5.1.3 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS

Los distintos aislados se cultivaron en medios BG 11 a pH 4 y 7 o en medio L1 a pH7 en las condiciones especificadas anteriormente. El crecimiento se siguió cada 3-5 días mediante espectroscopía (HITACHI-1130 Spectrophotometer) a 680 nm y en paralelo mediante recuento de células utilizando una cámara de Neubauer (Sigma-

Aldrich) utilizando un microscopio Axiovert 200M. Se realizó un análisis ANOVA para poder observar las diferencias entre los aislados cultivados a pH7 y a pH4.

3.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS

3.5.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Las microalgas aisladas fueron visualizadas con objetivos de 40x, 63X y 100x de aumento, en un microscopio Axioskop2 plus (Zeiss) y las fotografías tomadas utilizando una cámara CCD Coolsnap FX color (Roper Scientific) acoplada al microscopio.

3.5.2.2 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

La caracterización molecular de los aislados se llevó a cabo mediante la secuenciación parcial del gen 18S rRNA. 2 mL de cada uno de los cultivos en medio líquido fueron centrifugados durante 10 min a 5.000 rpm en una microcentrífuga (Hettich Mikro 120), lavándose el sedimento 2 veces con PBS 1X para eliminar el exceso de sales del medio. Para la extracción del DNA se utilizó el kit PowerPlant™ DNA Isolation kit (MOBIO) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación de los 18S rDNAs se llevó a cabo con el mismo procedimiento que para el 16S rDNA utilizando los cebadores 18comr1 y 18comf1 como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.4.2, con las condiciones especificadas en la figura 8b. La purificación y secuenciación de los productos de amplificación se llevaron a cabo según se especifica en el apartado 3.4.4 de esta sección, y las secuencias obtenidas y analizadas como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.4.5.

3.5.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS MICROALGAS AISLADAS

3.5.3.1 EFECTO DE CADMIO, COBRE, HIERRO Y PLOMO SOBRE LAS MICROALGAS AISLADAS

Todos los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos con cultivos de 12 mL. Las microalgas se cultivaron en los medios y en las condiciones habituales descritas en el apartado 3.5.1.1 durante 15 días.

3.5.3.1.1 Ensayo de tolerancia de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de metales

Los aislados, a una densidad de células inicial de 30.000 células mL⁻¹, fueron expuestos a diferentes concentraciones de los iones metálicos Cd (II) (CdSO₄·8/3H₂O), Cu (II) (CuSO₄·5H₂O), Fe (II) (FeSO₄·7H₂O) y Pb (II) (Pb(NO₃)₂) (Tab. 5). Se incluyó un cultivo control al que no se añadió metal. Todos los ensayos se realizaron por duplicado expresándose los resultados como la media aritmética de los datos ± su desviación estándar.

Tabla 5. Concentraciones de metales utilizadas en el experimento de tolerancia a metales.

Metal	Concentración				
	5,6 mgL ⁻¹	2,8 mgL ⁻¹	1,4 mgL ⁻¹	0,7 mgL ⁻¹	0,35 mgL ⁻¹
[Cd ²⁺]	5,6 mgL ⁻¹	2,8 mgL ⁻¹	1,4 mgL ⁻¹	0,7 mgL ⁻¹	0,35 mgL ⁻¹
[Cu ²⁺]	20 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	5 mgL ⁻¹	2,5 mgL ⁻¹	1,25 mgL ⁻¹
[Fe ²⁺]	60 mgL ⁻¹	30 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	7,5 mgL ⁻¹	3,75 μ gL ⁻¹
[Pb ²⁺]	160 mgL ⁻¹	80 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹	20 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹

Para seguir el crecimiento de las algas se retiraron alícuotas de los cultivos en los días 0, 3, 6, 10 y 15 y se midió la DO a 680 nm. A partir de las curvas de crecimiento de las muestras se realizó el análisis estadístico ANOVA con el test *ad hoc* de Bonferroni y se determinaron porcentajes de inhibición del crecimiento con respecto a los controles sin metales a los 15 días (Fisher, 1925; Bonferroni, 1936). Con los datos obtenidos de las densidades celulares, se calculó el índice IC₅₀ para cada cultivo correspondiente a la concentración del metal que reduce la densidad celular a la mitad frente al valor del control utilizando. Para ello se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Finalizados los 15 días de exposición a los metales se eligieron de cada cultivo aquellas muestras correspondientes a las máximas concentraciones de metal en el que se observaba crecimiento. Se registró fotográficamente el aspecto de las células tanto de los controles como de cultivos expuestos a los diferentes metales para observar eventuales variaciones morfológicas debidas a la exposición del cultivo al metal, utilizando un microscopio Axioskop2 plus (Zeiss) con una cámara CCD Coolsnap FX color (Roper Scientific) acoplada.

3.5.3.1.2 Exploración del potencial de las microalgas como biorremediadores de metales en solución

Entre los cultivos realizados para los estudios de tolerancia a metales pesados se eligieron aquellos con las concentraciones de metales más elevadas que no causaron una inhibición total del crecimiento de las microalgas tras 15 días de exposición. 1 mL de cada cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 30 min en una microcentrífuga Hettich Mikro 120 para eliminar la biomasa del medio de cultivo. La medición de la concentración de los iones metálicos presentes en el medio se realizó mediante TXRF en el SIDI de la UAM. El porcentaje de metal eliminado se expresa como la concentración de los iones metálicos presentes en el medio tras 15 días de incubación comparados con la concentración inicial de metal.

3.5.3.2 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs) A PARTIR DE CALDOS DE CULTIVO DE MICROALGAS. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y DE SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

3.5.3.2.1 Producción, síntesis y cinética de las AgNPs

Para la producción de las AgNPs se utilizaron los cultivos de microalgas en fase de crecimiento exponencial (recogidas a los 10 días) y en fase estacionaria (recogidas a los 25 días). Las condiciones de crecimiento fueron las descritas en el apartado 3.5.1.1. Para separar las células eucarióticas del medio de cultivo las muestras se centrifugaron 10 min a 6.000 rpm en una microcentrífuga Hettich Mikro 120. Los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo 1 min a 14.000 rpm para eliminar las eventuales células bacterianas o restos celulares presentes en el medio de cultivo. A los sobrenadantes obtenidos se añadió AgNO_3 a una concentración final de 1 mM y se expusieron a la luz visible ($60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a 20 °C. Como control negativo se utilizó medio BG11 con AgNO_3 1 mM, que se incubó en las mismas condiciones. Los ensayos se realizaron por duplicado. La biorreducción de Ag^+ a Ag^0 se monitorizó mediante espectrofotometría. Para la determinación de la cinética de formación de nanopartículas, se midieron las mezclas de reacción cada 30 min entre 300 y 700 nm en un espectrofotómetro (Hitachi-1130). Los espectros UV-Vis obtenidos fueron analizados para determinar la longitud de onda de máxima absorción de cada nanopartícula y para la construcción de las curvas de la cinética de síntesis realizadas a dicha longitud de onda con el programa Graphpad Prism.

3.5.3.2.2 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs: análisis de la cristalinidad de las nanopartículas por difracción de rayos X (XRD)

La caracterización fisicoquímica de las AgNPs se llevó a cabo mediante diferentes metodologías tales como i) **difracción de rayos X (XRD)** en este caso los análisis fueron realizados por el SIDI de la UAM, utilizando un difractómetro X'Pert PRO theta/2theta de Panalytical, con monocromador primario de Germanio (monocromador Johansson) y detector rápido X'Celerator. Las preparaciones de AgNPs se centrifugaron 30 min a 14.000 rpm y los sedimentos obtenidos se lavaron tres veces con agua destilada. Las suspensiones se depositaron sobre cubreobjetos de vidrio de 2x2 cm, dejándose secar al aire a temperatura ambiente. Estas preparaciones se conservaron a 4°C y en oscuridad hasta su análisis. El patrón de señales de los difractogramas fue analizado por el SIDI, asignándose las señales obtenidas a la Ag^0 (JCPDS file no. 04-0783); ii) **microscopía electrónica de transmisión (TEM)**, las observaciones se realizaron en el servicio de microscopía electrónica del CBMSO en un microscopio Jeol JEM1010 a 80 kV. 5 μL de las mezclas de reacción de AgNPs neosintetizadas se depositaron sobre rejillas de cobre ionizadas y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Las fotos se tomaron con una cámara TemCam F416 (TVIPS, Gauting, Alemania) con un sensor 4Kx4K. Se contaron al menos 500 nanopartículas por cada preparación de AgNPs y se analizaron utilizando el programa ImageJ64 (Rasband, W.S.,

ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Las distribuciones de tamaños se calcularon y se representaron con GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software, La Jolla California USA).

3.5.3.2.3 Actividad antibacteriana de las AgNPs

Para el ensayo de actividad antibacteriana se emplearon tres microorganismos: dos bacterias Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC29665) y *Escherichia coli* (ATCC10536) y una Gram positiva: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC6538P). Se prepararon inóculos de los microorganismos cultivándolos durante 8 h en medio nutritivo a 37 °C y con agitación a 250 rpm. Se reinocularon a una dilución 1/100 y se cultivaron hasta fase estacionaria, siendo diluidos con medio fresco hasta una densidad óptica (DO) a 550 nm de 0.10. Las AgNPs se prepararon como se ha indicado anteriormente siguiendo su formación por espectrofotometría. Una vez alcanzada la máxima absorbancia a la longitud de onda máxima de cada tipo de nanopartícula, éstas se recogieron por centrifugación durante 30 min a 14.000 rpm y a 4 °C. Los sedimentos obtenidos se lavaron con agua desionizada y finalmente fueron resuspendidos en un volumen de agua desionizada equivalente a 1/10 del volumen de la mezcla de reacción de la que se partió. A partir de esta suspensión de las nanopartículas se realizaron siete diluciones seriadas con factor de dilución 1/2 en agua desionizada. Estas diluciones se añadieron a los cultivos de los distintos microorganismos a razón de 10 µL/200 µL en los pocillos de placas de microtítulo de fondo plano (Nunclon® MicroWell plates, Sigma-Aldrich, USA) y por duplicado. En cada placa se incluyeron controles correspondientes al medio de cultivo, cultivos bacterianos sin nanopartículas y de nanopartículas a las distintas concentraciones sin microorganismos. El crecimiento de las bacterias se midió registrando la DO a 550 nm en intervalos de 1h durante 12 horas, con agitación durante 5 seg. previa a la medida en un lector de placas (Multilector de fluorescencia FLUOstar OPTIMA BMG-LABTECH). Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism. En base a los datos obtenidos se determinaron las concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀) de cada tipo de nanopartícula para cada una de las tres bacterias testigo empleadas, utilizando un modelo de dosis respuesta logarítmica.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA ZONA DE INFLUENCIA MAREAL

4.1.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

El río Tinto lleva siendo objeto de estudio desde hace décadas, principalmente desde su origen (Peña de Hierro) hasta La Palma del Condado, caracterizadas por un pH ácido constante (2,3) y una elevada concentración de metales pesados en solución (López-Archilla y col., 1993; López-Archilla y col., 2001; Amaral Zettler y col., 2002; Gonzalez-Toril y col., 2003b; Aguilera y col., 2006b; Aguilera y col., 2007b; Sánchez-Andrea y col. 2012; García-Moyano y col., 2012). Sin embargo, hasta el inicio de este trabajo no se había realizado ningún estudio sobre la diversidad microbiana existente en zona intermareal donde confluye el agua del río con la del Océano Atlántico.

Para determinar cuál sería la zona de estudio más adecuada para este trabajo, se realizó un primer muestreo en marea alta y en marea baja desde La Palma del Condado hasta el estuario del río, (Fig. 7). Se realizaron los muestreos de acuerdo a las tablas de las mareas⁵ en el día con máxima diferencia entre alta y baja marea, determinándose *in situ* los valores de pH, conductividad, salinidad y concentración de oxígeno (Tab. 6) y recogiendo muestras de agua para un posterior análisis elemental.

Tabla 6. Media de las mediciones *in situ* con la sonda multiparamétrica desde La Palma del Condado hasta La Rábida en alta (MA) y en baja (MB) marea.

	La Palma del Condado		Niebla		San Juan del Puerto		Moguer		La Rábida	
	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB
T (°C)	17,8	15,5	17,9	15,6	18,0	15,5	17,9	15,6	18,0	15,7
pH	3,0	3,6	2,7	3,2	6,5	3,4	6,6	7,1	7,2	7,7
Cond (mScm⁻¹)	8,5	7,9	4,0	3,1	37,0	8,6	54,0	51,1	66,0	63,2
Sal (‰)	4,8	4,2	1,9	1,6	30,0	4,8	33,8	33,6	42,4	41,9
Eh (mV)	430	403	450,0	492,0	260,0	494,0	149,0	149,9	112,0	113,6

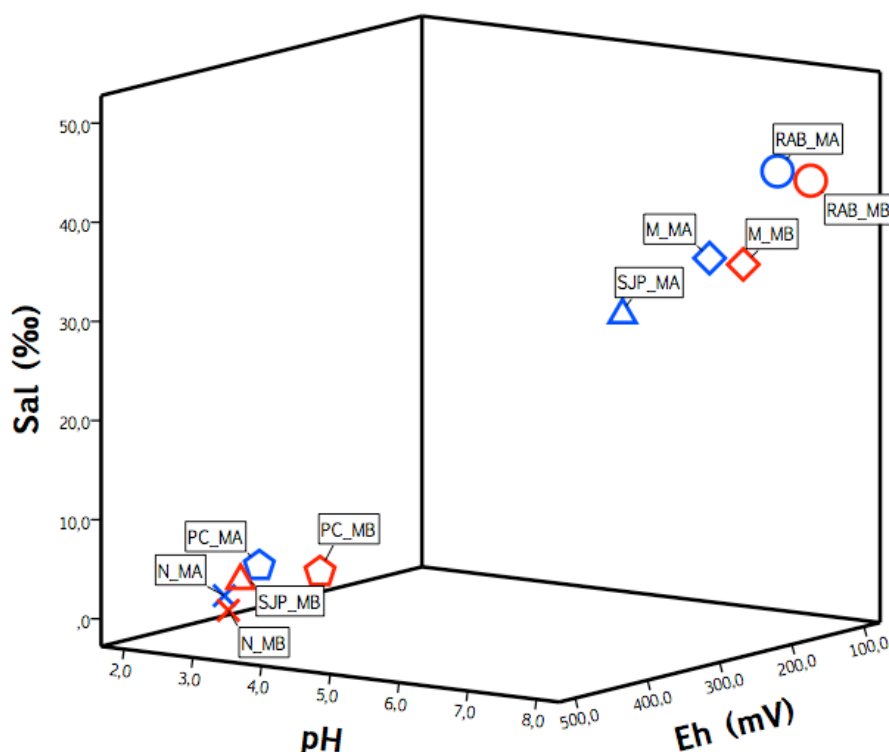
De acuerdo a estos valores, se pueden dividir las muestras en dos grupos marcados por sus características físico-químicas, consecuencia de la influencia mareal a la que son sujetos.

Las muestras de marea alta y marea baja tomadas en Niebla y en La Palma del Condado reflejan las características de las aguas ácidas del río Tinto, con una media de salinidad alrededor del 3‰ y un pH que varía entre 2,7 y 3,3.

Por lo tanto, no observamos influencia mareal, teniendo los valores de pH muy poca variación en las dos medidas de marea alta y baja y siendo la salinidad típica de las aguas continentales (Fig. 9).

⁵ Instituto Hidrográfico de la Marina, Ministerio de Defensa

Figura 9. Representación de las muestras según las mediciones realizadas *in situ* de pH, salinidad y potencial Redox.



Por lo contrario, en las dos muestras más cercanas a la desembocadura del río, Moguer y la Rábida, se observaron valores similares a los del agua del mar con una salinidad entre 34 y 42‰ y un pH alrededor de 7. Caso a destacar es el de SJP, cuya muestra tomada en marea baja se agrupó claramente con las que presentaban las características del río, con una salinidad de 4,8‰ y un pH de 3,4, mientras la que se tomó en marea alta presentaba características similares a las aguas marinas: un pH de 6,5 y una salinidad de 30‰.

Como puede observarse, en San Juan del Puerto se alternan diariamente dos tipos de sistemas acuáticos muy diferentes: el marino, llevado por la corriente del mar y el ácido procedente de las aguas del río Tinto. A la vista de estos valores se eligió la zona accesible de SJP como principal punto de estudio y RAB como control al ser el punto más alejado del origen del río.

4.1.2 ANÁLISIS ELEMENTAL

A partir de las muestras obtenidas en los distintos puntos de muestreo se realizó un análisis elemental por TXRF. Para los puntos de muestreo PDC, N, M y RAB se utilizó la muestra recogida en la hora correspondiente a la marea alta. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Cabe destacar que la muestra recogida en marea baja en SJP se asocia a las muestras PC y N, observándose concentraciones elevadas de Fe ($103,8 \text{ mgL}^{-1}$, 83 mgL^{-1} , 69 mgL^{-1} respectivamente), de Cu (15 mgL^{-1} , 12 mgL^{-1} y 14 mgL^{-1}) y de Zn ($17,5 \text{ mgL}^{-1}$, 14 mgL^{-1} y 17 mgL^{-1}). Por lo contrario, elementos como

el Al, P, Cl, K, Ca o Br tienen concentraciones más elevadas en la muestra de marea alta de SJP similares a las de las zonas M y RAB con mayor influencia oceánica. Elementos como el S muestran elevadas concentraciones en todos los puntos de muestreo, reflejando por un lado la aportación de SO_4^{2-} debido a la biolixiviación de los sulfuros metálicos de la Faja Pirítica Ibérica y por otro la aportación de los sulfatos de las aguas oceánicas.

Tabla 7. Análisis elemental de las muestras de los distintos puntos de muestreo por TXRF.

Elementos (mgL ⁻¹)	La Palma del Condado	Niebla	San Juan del Puerto		Moguer	La Rábida
			marea baja	marea alta		
Al	157,5	126,0	196,0	804,0	938,0	1067,0
Si	737,5	590,0	564,0	697,0	509,0	813,0
P	33,8	27,0	31,0	70,0	76,0	70,0
S	603,8	483,0	680,0	1213,0	1433,0	1295,0
Cl	40,0	32,0	1355,0	13763,0	17854,0	17480,0
K	12,5	10,0	40,0	325,0	356,0	377,0
Ca	146,3	117,0	189,0	413,0	439,0	405,0
Ti	30,0	24,0	24,0	25,0	25,0	25,0
Mn	10,0	8,0	9,0	1,8	0,6	0,4
Fe	103,8	83,0	69,0	1,0	0,4	0,3
Ni	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
Cu	15,0	12,0	14,0	1,2	0,2	0,1
Zn	17,5	14,0	17,0	1,1	0,3	0,2
As	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
Br	0,2	0,2	5,0	88,0	105,0	107,0
Sr	0,7	0,6	2,0	8,0	11,0	12,0

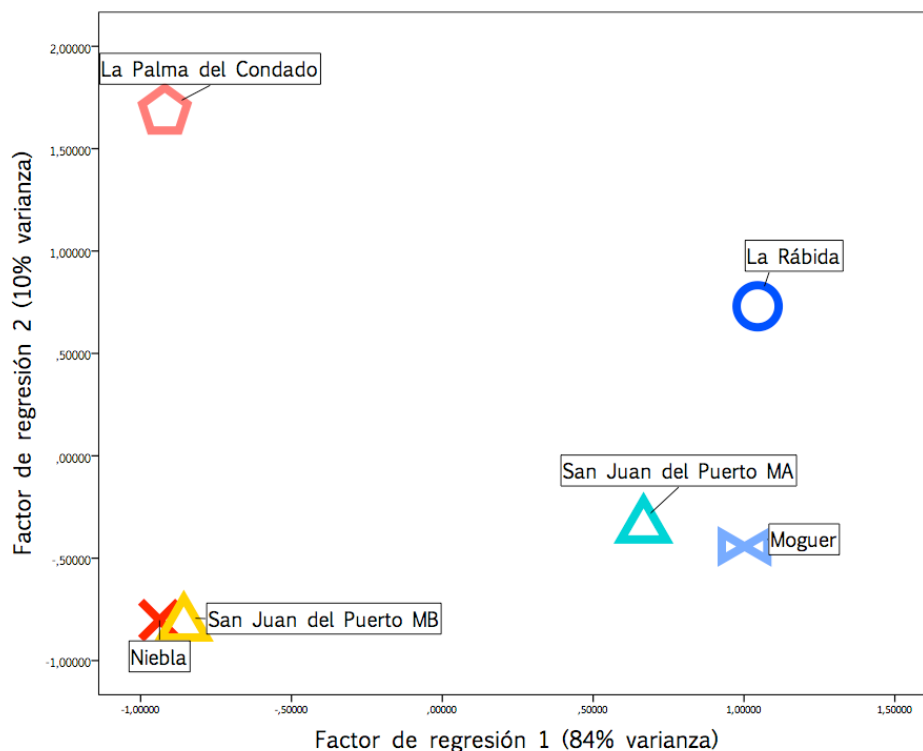
4.1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objetivo de evaluar los datos procedentes de las mediciones *in situ* y el análisis elemental se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) mediante la utilización del programa SPSS. El análisis PCA considera simultáneamente diversas variables correlacionadas e identifica el mínimo número de componentes no relacionados entre sí necesario para explicar los datos. En la gráfica de sedimentación (Anexo I, Fig. 1) y en la tabla de la varianza total explicada (Anexo I, Tab. 1), además de los 21 componentes, se muestra el valor explicado por cada componente, el porcentaje de varianza para cada uno de ellos y su porcentaje acumulado.

Se observa cómo las 21 variables analizadas tienen una relación lineal entre sí, ya que el primer componente consigue agrupar el 84% de la diversidad del sistema. El primer componente se forma a partir de las variables con mayor varianza y los siguientes componentes se basan en las variables no relacionadas con el componente precedente. En este caso la primera y segunda variables por sí solas explican más del 90% de la varianza total, siendo suficientes para explicar la varianza de las variables estudiadas y poder distribuir las muestras en dos dimensiones (Fig. 10). En el Anexo I (Tab. 2) se

muestra la matriz factorial que indica la carga de cada variable en cada factor extraído, de forma que los factores con pesos factoriales más elevados en términos absolutos indican una relación estrecha con las variables.

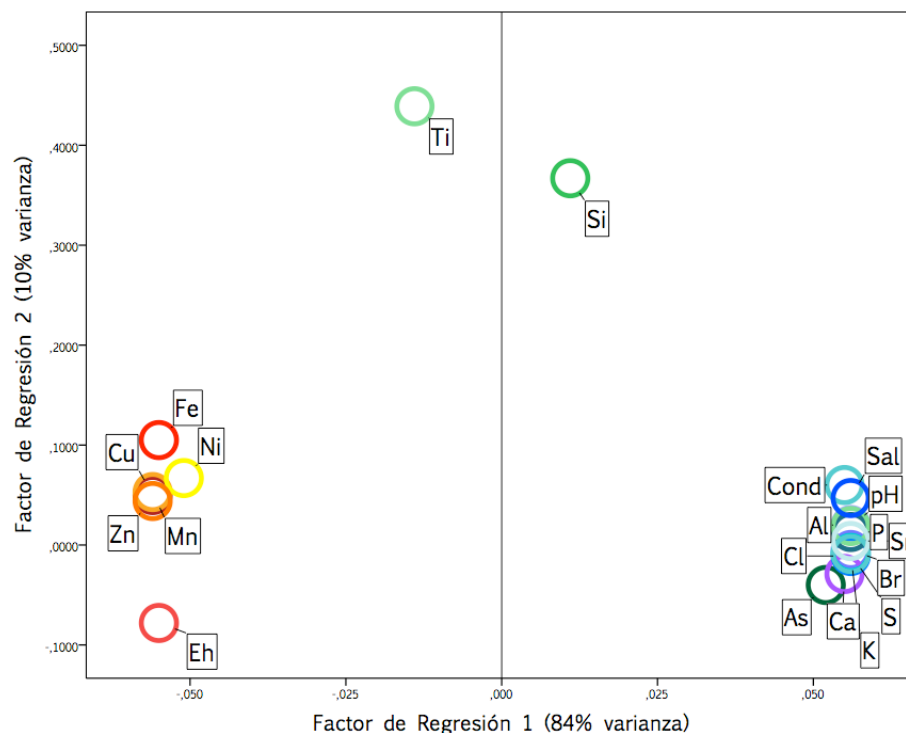
Figura 10: Distribución de las muestras según el Análisis de Componentes Principales de las variables físico químicas medidas en las distintas muestras.



Se observa en la tabla que la primera componente describe la mayoría de las variables estudiadas y que pH, conductividad, salinidad y los elementos Al, P, S, Cl, K, As, Br, Sr y Ca varían juntos y de manera inversamente proporcional a Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn. En la representación de la distribución de los puntos de muestreo según el conjunto de todas las características físico-químicas medidas, se confirman las primeras observaciones hechas *in situ*: existe una diferencia notable en San Juan del Puerto entre la muestra de marea alta y de marea baja. La salinidad, el pH y la concentración de los elementos varían de acuerdo a la marea, con una alternancia marea-dependiente entre un ambiente de aguas continentales ácidas, ricas en metales pesados y un sistema con características muy próximas a las del agua del mar.

En la figura 11 se representa cómo se distribuyen las variables según los datos obtenidos en la matriz de coeficientes de las puntuaciones factoriales (Anexo I, Tab. 3). En este caso se observa una fuerte linealidad entre casi todos los factores: pH, salinidad, conductividad y elementos asociables a aguas oceánicas que son inversamente proporcionales a los metales Cu, Fe, Mn, Ni y Zn, distribuidos en posiciones opuestas del primer componente, que explica el 84% de la diversidad.

Figura 11. Distribución de las variables analizadas según los coeficientes de las puntuaciones factoriales extraídas en el análisis PCA



4.1.4 SAN JUAN DEL PUERTO Y LA RÁBIDA

SJP y RAB fueron los puntos elegidos, tras el análisis de los parámetros físico-químicos, para llevar a cabo los experimentos de análisis de diversidad biológica y compararlos con los procedentes de estudios anteriores centrados en las aguas ácidas y ricas en metales pesados (Gonzalez-Toril y col., 2003b; Amaral Zettler y col., 2011; García-Moyano y col., 2012).

Con el objetivo de describir la variabilidad estacional de la comunidad microbiana en las dos zonas elegidas, se recogieron muestras a lo largo de un año en primavera, verano, otoño e invierno según se describe en el apartado 3.2. de Materiales y Métodos, coincidentes con la mayor diferencia mareal del mes. También se tomó una muestra en el periodo de menor variación mareal, que coincidió con la finalización de la primavera (muestra MM).

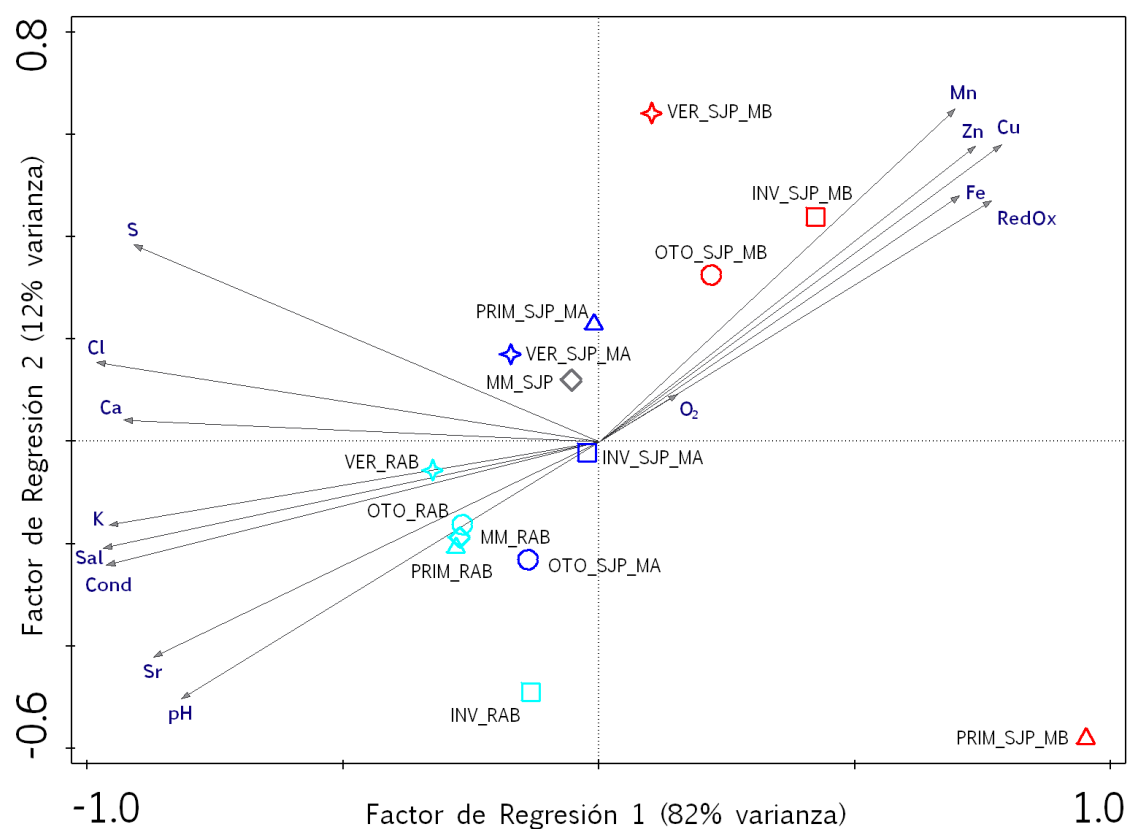
En la tabla 8 se recogen las medias de las mediciones realizadas con la sonda multiparamétrica de los valores de temperatura, pH, salinidad, conductividad, potencial redox y O_2 de SJP y RAB a lo largo de los diferentes muestreos, así como los valores de distintos elementos medidos por TXRF.

Tabla 8: Mediciones *in situ* de parámetros físico-químicos y resultado del análisis elemental realizada por TXRF.

Muestra	pH	Cond mV	sal ‰	RedOx mV	O mgL ⁻¹	S ugL ⁻¹	Cl ugL ⁻¹	K ugL ⁻¹	Ca mgL ⁻¹	Mn mgL ⁻¹	Fe mgL ⁻¹	Cu mgL ⁻¹	Zn mgL ⁻¹	Sr mgL ⁻¹
PRIM_SJP_MB	3,17	2,43	1,25	455,67	8,27	0,00	0,00	0,01	86,42	4,44	14,49	9,91	9,98	0,40
PRIM_SJP_MA	4,74	20,47	12,30	255,00	4,78	1,15	5,63	0,11	197,68	2,23	3,48	3,96	4,58	2,63
PRIM_RAB	7,63	46,97	30,51	119,00	7,70	2,20	21,96	0,31	407,84	0,16	0,19	0,08	0,15	7,48
VER_SJP_MB	3,70	12,19	6,96	425,00	8,31	1,45	3,84	0,07	249,18	7,98	16,59	10,27	12,94	1,77
VER_SJP_MA	5,52	35,11	22,09	256,67	5,51	1,92	17,90	0,28	437,29	2,64	1,01	2,20	3,49	5,14
VER_RAB	7,60	51,26	33,68	115,43	6,45	4,17	32,37	0,50	487,46	0,11	3,55	0,04	0,00	9,70
OTO_SJP_MB	2,86	12,11	6,89	473,10	7,90	0,41	1,04	0,03	261,35	6,38	4,50	8,69	11,72	1,85
OTO_SJP_MA	5,53	38,63	24,33	187,00	1,46	0,61	9,73	0,20	304,00	1,28	0,00	0,28	2,02	8,70
OTO_RAB	6,23	47,60	31,40	204,00	6,02	2,29	19,73	0,33	383,43	0,09	1,30	0,04	0,13	10,80
INV_SJP_MB	2,79	7,15	3,90	401,00	9,12	0,33	0,12	0,03	144,56	7,00	44,26	14,70	15,62	1,26
INV_SJP_MA	5,00	31,52	19,63	241,70	6,63	0,50	4,72	0,18	238,68	1,34	0,39	3,98	6,83	6,09
INV_RAB	7,30	48,96	31,90	118,66	10,00	0,50	4,88	0,18	255,00	0,00	0,15	0,00	0,25	15,23
MM_SJP	4,37	31,57	19,58	135,13	18,37	0,64	9,31	0,15	254,20	3,89	0,63	4,18	6,88	4,34
MM_RAB	7,55	50,73	33,26	114,00	11,17	2,29	19,73	0,33	383,43	0,09	1,30	0,04	0,13	10,80

En la figura 12 se representa la distribución, según el análisis de Componente Principales realizado a través del programa CANOCO, de las diferentes muestras según las medidas ambientales y el análisis elemental en SJP y RAB.

Figura 12. Distribución de las muestras de SJP de marea alta (en azul) y baja (en rojo), de RAB (turquesa) y de la marea media (gris) en las estaciones primavera (triángulo) verano (cruz) otoño (círculo) e invierno (cuadrado).



Existe una evidente relación, a lo largo de los dos factores de regresión, entre todas las muestras recogidas en San Juan del Puerto en marea baja, todas las de la Rábida y la de la marea media que se agrupa junto con las muestras recogidas en San Juan del Puerto durante la marea alta. Se puede observar a lo largo de la primera componente (que explica un 82% de la varianza) que parámetros estrechamente relacionados como la salinidad, la conductividad, pH, Cl y K, son inversamente proporcionales a los metales Fe, Cu, Zn, Mn y al potencial Redox.

Normalmente, las principales características hidroquímicas de los sistemas de estuarios se definen por los procesos de mezcla entre las masas de agua dulce de origen fluvial, y en este caso ácida, y el agua salada procedente del océano (Crump y col., 2004).

Las zonas objeto de estudio de este trabajo muestran en el análisis de los factores abióticos medidos, que la muestra RAB tiene características asimilables a las aguas oceánicas y que la mezcla de las aguas dependiente de la marea en SJP es responsable de la existencia de la alternancia de dos ambientes bien diferenciados en sus características físico-químicas.

Este análisis coloca las muestras de marea baja junto con las que se recogieron en las zonas más cercanas al origen del río, y las de marea alta y de marea media junto a las de RAB.

4.1.5 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA

Las muestras correspondientes a SJP recogidas en alta y baja marea y RAB se utilizaron para realizar estudios comparativos sobre la diversidad microbiana asociada a las cuatro estaciones y correlacionar la presencia o ausencia de determinados microorganismos con las características físico-químicas asociadas a la diferencia mareal, tal y como las muestras recogidas con diferencia mareal mínima en los dos puntos de muestreo. Con el fin de obtener una visión global sobre la diversidad microbiana existente en las muestras bajo estudio, se ha utilizado el gen 16S rRNA y mediante su amplificación, clonación, secuenciación y análisis filogenético se ha llevado a cabo este estudio.

4.1.5.1 CLONACIÓN DEL GEN 16S rRNA

La extracción del DNA de las diferentes muestras y la posterior amplificación y clonación del gen 16S rRNA, se llevó a cabo según se especifica en los apartados 3.4.2 y 3.4.3 de Materiales y Métodos. Como resultado de la clonación se obtuvieron un total de 1134 clones agrupados en 14 librerías. Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante el programa DNABaser eliminándose las quimeras tras el análisis de las secuencias completas. La asignación taxonómica se basó en la comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en el *GenBank* mediante el programa BLAST. Los resultados de afiliación filogenética de los clones obtenidos (Anexo I, Tab. 4 a Tab. 17), se resumen en la tabla 9 (géneros) y en la tabla 10 y figuras 13 y 14 (clases). Se han identificado en San Juan del Puerto clones correspondientes a los géneros *Acidiphilium*, *Acidobacterium*, *Acidocella* y *Ferrimicrobium*, prevalentemente en los

muestreos de marea baja, todos ellos constituidos por bacterias acidófilas, la mayoría identificados previamente en la zona de pH ácido constante (zona de no influencia mareal) del río Tinto por distintos autores (López-Archilla y col., 1993; Gonzalez-Toril y col., 2003b; García-Moyano y col., 2012).

En muestras de marea baja se han identificado clones de la bacteria desnitrificante oxidadora de Fe del género *Acidovorax*, la cual ha sido detectada recientemente en el subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica, aunque no ha sido reportada previamente en la columna de agua del río (Amils y col., en preparación). No se han encontrado clones de los géneros *Leptospirillum* ni *Acidithiobacillus* que tienen una fuerte relevancia ecológica en la parte del río más cercana al origen, no influenciada por las mareas, lo que demuestra su extrema sensibilidad a cambios ambientales en el ecosistema.

También se han detectado en muestras de marea baja clones del género *Clostridium* previamente identificadas en la columna de agua del río y de *Halothiobacillus* en este caso en una muestra de marea alta y otra de marea baja en distintas épocas del año. En muestras de marea alta de San Juan del Puerto se han identificado clones de géneros de bacterias de posible origen marino, ya que se identifican en muestras de la Rábida y no aparecen en las muestras de marea baja (influencia del río) como *Limnobacter*, *Marinomonas*, *Rhodobacter*, *Polaribacter*, *Pelagibacter*, *Sulfitobacter* y *Arenibacter*. Así mismo se han identificado clones que aparecen en ambos tipos de mareas y en la Rábida lo que indica su origen marino y su resistencia a condiciones ácidas y de elevadas concentraciones de metales como *Arcobacter*, *Methylophaga*, *Mesorhizobium*, *Marinobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*. La única excepción corresponde a clones identificados como pertenecientes al género *Nitratireductor* que no se han identificado en la Rábida (Amaral Zettler y col., 2011).

La mayoría de la diversidad observada en la zona de influencia mareal de la cuenca del Tinto pertenece al phylum Proteobacteria, fundamentalmente a las clases Alpha y Gammaproteobacteria (Tabla 10, Figs.13 y 14). En todas las muestras recogidas en San Juan del Puerto de marea media y marea alta y en la Rábida se encuentran microorganismos típicos de ambientes marinos: Flavobacterias y Proteobacterias de las clases Alfa, Beta, Gamma, y Epsilon. En las muestras correspondientes a la marea baja se encuentran microorganismos acidófilos como las pertenecientes a la clase Acetobacteracea y Alfaproteobacteria todas ellas identificadas previamente en ambientes ácidos extremos y en la parte de la cuenca del Tinto no sujeta a influencia mareal (García-Moyano y col. 2012, Gonzalez-Toril y col. 2003b Sánchez-Andrea y col, 2012).

Los resultados obtenidos mediante la clonación del gen 18S rRNA no se corresponden con el nivel de diversidad eucariótica obtenida por observación directa por microscopía óptica de las distintas muestras analizadas por lo que se ha considerado oportuno no incluir estos datos en el análisis de diversidad y circunscribirnos al análisis de la influencia de la variación de las condiciones ambientales en la diversidad bacteriana del ecosistema.

Tabla 9. Número de clones asociados a distintos géneros en las muestras de San Juan del Puerto y de La Rábida obtenidas en alta y baja marea y en distintas épocas del año. Comparación con los trabajos de (Palacios y col., 2008; García-Moyano y col., 2012).

Clase	Género	SJP										RAB					Géneros comunes	
		PRIM		VER		OTO		INV		MM		PRIM	VER	OTO	INV	MM	2008 Palacios	2012 García-Moyano
		AM	BM	AM	BM	AM	BM	AM	BM									
Acetobacteraceae	<i>Acidocella</i>	-	6	-	35	-	10	2	10	6		-	-	-	-	-		●
Acidimicrobiia	<i>Ferrimicrobium</i>	-	15	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		●
Acidobacteriia	<i>Acidobacterium</i>	-	11	2	4	4	2	-	-	-		-	-	-	-	-	●	●
	<i>Agrococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Aquiluna</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-		-	4	4	-	11		
	<i>Chryseoglobus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	2	-		
	<i>Frigoribacterium</i>	-	-	-	-	-	-	4	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Microcella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6		-	1	-	11	4		
	<i>Micrococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
	<i>Rhodoluna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	1		
	<i>Salinibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	1	-		
Alphaproteobacteria	<i>Acidiphilium</i>	4	8	-	21	-	57	-	38	-		-	-	-	-	-	●	●
	<i>Acidovorax</i>	-	6	-	-	-	-	-	8	-		-	-	-	-	-		
	<i>Aestuariivita</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	2	-	-	-		
	<i>Donghicola</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Haematobacter</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Hoeflea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	2		
	<i>Jidaibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	2	-		
	<i>Loktanella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		2	-	-	-	-		
	<i>Lutibaculum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Magnetospira</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	2	-	-		
	<i>Mesorhizobium</i>	-	-	8	7	-	6	22	-	-		-	1	-	-	-		
	<i>Midichloria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	1	-		
	<i>Nitrateductor</i>	6	-	6	-	-	2	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Oceanibaculum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1	-	-	-	-		
	<i>Oceanicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	2	-	-		
	<i>Paenochrobactrum</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Paracoccus</i>	-	-	4	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Pararhodobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Pelagibaca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
	<i>Pelagibacter</i>	-	-	-	-	8	-	-	-	-		-	13	18	-	10		
	<i>Phaeobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	3	-	-		
	<i>Primorskyibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1	-	-	-	-		
	<i>Pseudoruegeria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Rhodobaca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Rhodobacter</i>	29	-	8	-	-	-	-	-	2		1	-	1	-	-		
	<i>Rhodomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3		-	-	-	-	-		
	<i>Rhodopseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Rhodospirillum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Roseicetrum</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Roseobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1	-	-	-	-		
	<i>Ruegeria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
	<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
	<i>Sulfitobacter</i>	-	-	-	-	-	-	4	-	-		4	-	2	1	-		
	<i>Thalassobaculum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
	<i>Thalassococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	1	-	-		
	<i>Tistrella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
Bacilli	<i>Bacillus</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
Bacteroidia	<i>Cytophaga</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
Balneolia	<i>Balneola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	1	-	-		
Betaproteobacteria	<i>Denitromonas</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-		-	-	-	-	-		
	<i>Limnobacter</i>	8	-	10	-	-	-	33	8	-		-	-	-	1	-		
	<i>Methylobacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	1	-		
	<i>Methylopusillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	3	1	-		
	<i>Ralstonia</i>	-	-	6	-	-	-	-	-	-		-	1	-	-	-		
Clostridia	<i>Clostridium</i>	-	-	-	2	-	2	-	-	-		-	-	-	-	-		●
	<i>Thauera</i>	-	-	4	-	-	-	-	6	-		-	-	-	-	-		
Coscinodiscophyceae	<i>Rhizosolenia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	7		-	-	-	-	-		
Cyanophyceae	<i>Synechococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	9	-	-	2		

Clase	Género	SJP										RAB					Géneros comunes	
		PRIM		VER		OTO		INV		MM		PRIM	VER	OTO	INV	MM	2008	2012
		AM	BM	AM	BM	AM	BM	AM	BM									
Cytophagia	<i>Belliella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Flexibacter</i>	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Flexithrix</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	1	-		
	<i>Marinoscillum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Roseivirga</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-		
Deltaproteobacteria	<i>Desulfobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-		
Epsilonproteobacteria	<i>Arcobacter</i>	-	-	16	12	45	10	-	18	-	-	-	-	1	1	-		
Flavobacteriia	<i>Aquibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
	<i>Arenibacter</i>	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	2	-	1	-		
	<i>Aureimarina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-		
	<i>Aureivirga</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Flavobacterium</i>	2	-	-	-	-	2	12	-	12	-	1	-	2	1	-		
	<i>Fluviicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-		
	<i>Gilvibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-	-	-	-		
	<i>Lutibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-		
	<i>Maribacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Meridianimaribacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-		
	<i>Polaribacter</i>	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	1	-	1	-	-		
	<i>Robiginitalea</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-		
	<i>Tenacibaculum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-		
	<i>Winogradskyella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-		
Gammaproteobacteria	<i>Francisella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Glaciecola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-		
	<i>Haliea</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	6	-	1	-	1	-	-		
	<i>Halioglobus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-		
	<i>Halotalea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-		
	<i>Legionella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-		
	<i>Luminiphilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3	-	-	-		
	<i>Luteimonas</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Marinobacter</i>	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	-	2	-	-	-		
	<i>Marinobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	1	2	-	-		
	<i>Marinomonas</i>	6	-	-	-	2	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-		
	<i>Methylococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2		
	<i>Methylomicrobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Methylomonas</i>	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Methylophaga</i>	39	-	8	2	53	34	-	4	8	-	-	-	3	-	-		
	<i>Microbulbifer</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-		
	<i>Neptuniibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-		
	<i>Neptunomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-		
	<i>Oleiphilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-		
	<i>Porticoccus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-		
	<i>Pseudomonas</i>	-	-	2	-	-	-	2	4	-	2	-	2	-	-	-		
	<i>Spongiibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Succinivibrio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
	<i>Teredinibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Thalassolituus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-		
	<i>Thiohalobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-		
	<i>Thiolapillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-		
	<i>Vibrio</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-		
	<i>Aggregatibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
	<i>Alcanivorax</i>	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
	<i>Alkalimarinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
	<i>Aquicella</i>	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Chromatococcus</i>	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Dyella</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Halothiobacillus</i>	10	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Phycisphaerae	<i>Phycisphaera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
Rhodothermia	<i>Rubrivirga</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-		
Thermomicrobia	<i>Thermobaculum</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tabla 10. Número de clones asociados a distintas clases, en las muestras de San Juan del Puerto y La Rábida en distintas épocas del año. Comparación con las clases encontradas en los trabajos realizados por (Palacios y col., 2008; Amaral Zettler y col., 2011; García-Moyano y col., 2012a).

Clase	SJP										RAB					Géneros comunes		
	PRIM		VER		OTO		INV		MM		PRIM	VER	OTO	INV	MM	2008	2012	2011
	AM	BM	AM	BM	AM	BM	AM	BM								Palacios	García-Moyano	Amaral-Zettler
Acetobacteraceae	-	6	-	35	-	10	2	10	6	-	-	-	-	-	-			
Acidimicrobiia	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Acidobacteriia	-	11	2	4	6	2	4	-	6	-	6	4	14	16				
Alphaproteobacteria	43	14	26	32	10	65	26	46	5	10	20	36	4	12				
Bacilli	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-			
Bacteroidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-			
Balneolia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-			
Betaproteobacteria	8	-	16	-	-	2	33	8	-	-	1	3	3	-	-			
Clostridia	-	-	4	2	-	2	-	6	-	-	-	-	-	-	-			
Coscinodiscophyceae	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-			
Cyanophyceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	2	-			
Cytophagia	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	1	5	2	-	-			
Deltaproteobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-			
Epsilonproteobacteria	-	-	16	12	45	10	-	18	-	-	-	1	1	-	-			
Flavobacteriia	9	-	-	-	-	2	43	-	15	6	14	1	6	2	-			
Gammaproteobacteria	63	-	10	16	67	40	8	14	23	9	7	23	9	2				
Phycisphaerae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-			
Rhodothermia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-			
Thermomicrobia	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Figura 13. Abundancia relativa por clase de los microorganismos encontrados en las muestras de San Juan del Puerto. a) MM, b) PRIM_MA, c) PRIM_MB, d) VER_MA, e) VER_MB, f) OTO_MA, g) OTO_MB, h) INV_MA i) INV_MB

SAN JUAN DEL PUERTO

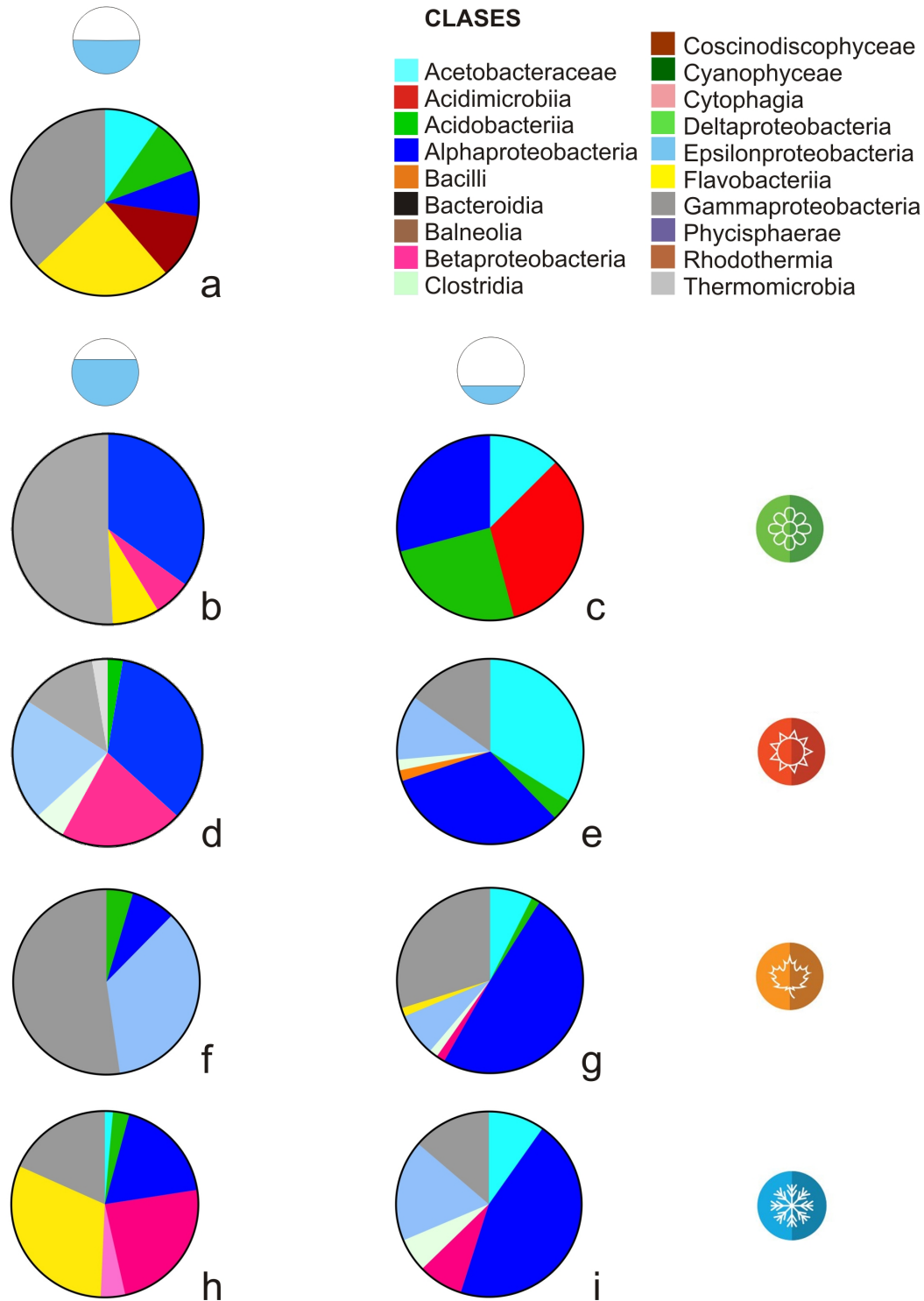
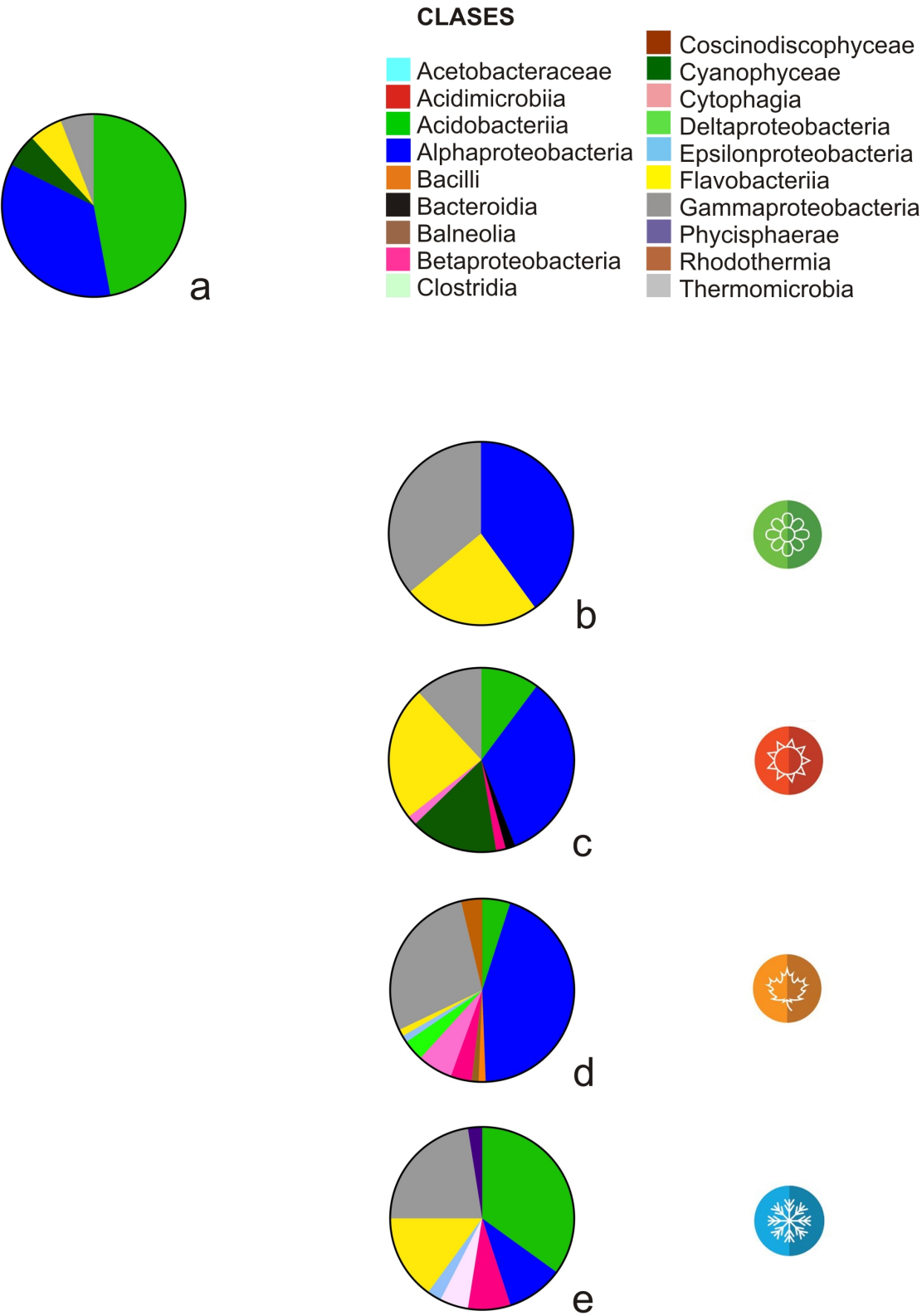


Figura 14. Abundancia relativa por clase de los microorganismos encontrados en las muestras de La Rábida. a) MM, b) PRIM c) VER, d) OTO, e) INV.

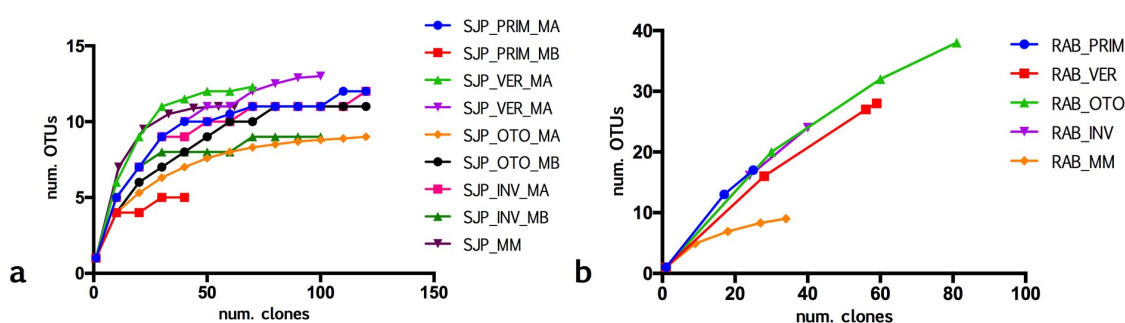
LA RÁBIDA



4.1.5.2 ÍNDICES DE DIVERSIDAD

Existen diferentes enfoques para estimar la diversidad biológica de un ecosistema. La diversidad α representa la diversidad de especies dentro de una comunidad biológica y considera dos variables: i) la riqueza de especies, y ii) la abundancia relativa de especies. Dos muestras pueden tener la misma riqueza y abundancia de especie y sin embargo no compartir ningún taxón. La diversidad β mide las diferencias entre diferentes comunidades considerando esos mismos parámetros, riqueza y abundancia relativa de especies. En este trabajo se evaluó la diversidad α a través de la rarefacción y del índice de Shannon-Weiner (Palacios y col., 2008). Se obtuvieron las curvas de rarefacción con el fin de comprobar que los datos obtenidos por clonación fueran representativos del sistema estudiado. La figura 15a muestra las curvas de acumulación para las nueve librerías obtenidas a partir de las muestras de SJP y en la 15b se representan los resultados de las muestras pertenecientes a RAB, todas ellas con un intervalo de confianza del 97%.

Figura 15. Curvas de rarefacción de las librerías genéticas creadas para el análisis de la diversidad bacteriana asociada a las muestras de: a) San Juan del Puerto (SJP), b) La Rabida (RAB).



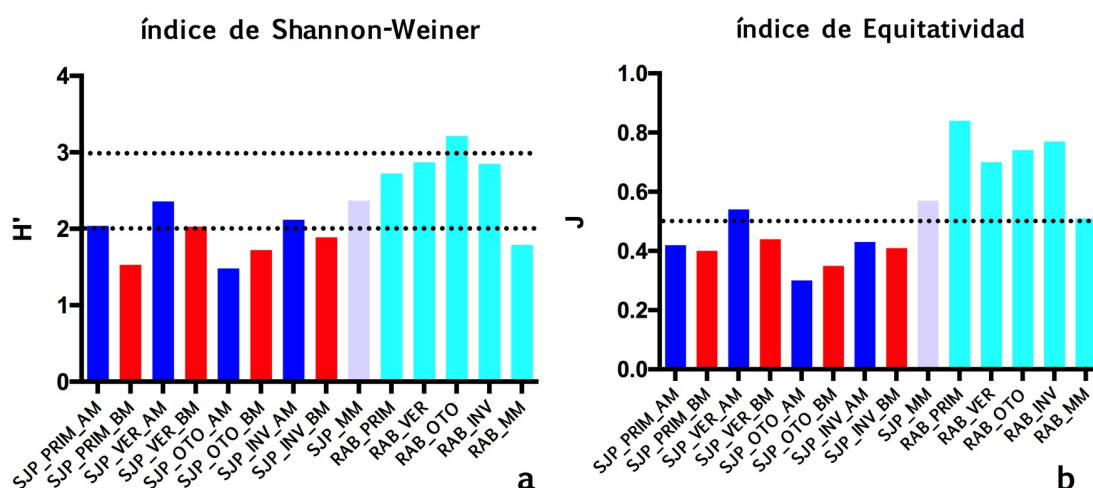
A medida que aumenta el número de clones analizados aumenta el número de filotipos diferentes encontrados, hasta llegar a un punto en el que la gráfica se hace asintótica, lo que indica que se ha cubierto suficientemente la riqueza existente en la muestra. Tal y como puede observarse en la figura 15a las curvas de acumulación se hacen asintóticas en todas las librerías de las muestras de SJP, por lo que se puede considerar que dichas librerías tienen una buena cobertura y reflejan la diversidad real existente en las muestras correspondientes. Este no es el caso para las muestras de la Rábida (Fig. 15b) probablemente debido a su posición geográfica y por lo tanto a una mayor influencia oceánica. En este caso sería aconsejable aumentar el número de secuencias analizadas con el fin de cubrir de manera más amplia la diversidad real existente en la muestra.

Analizando los géneros identificados mediante el índice de Shannon-Weiner (Tab. 11 y Fig. 16a), en el caso de las muestras de marea baja recogidas en SJP en primavera, verano e invierno, se evidencia una diversidad inferior con respecto a las muestras recogidas en marea alta, a excepción de las muestras de otoño que tienen un valor bajo de diversidad, y un índice H' más alto para la muestra de marea baja.

Tabla 11. Índices de Shannon-Weiner (H') y de Equitatividad (J) para las distintas muestras analizadas

		SJP								RAB					
		PRIM		VER		OTO		INV		MM	PRIM	VER	OTO	INV	MM
		AM	BM	AM	BM	AM	BM	AM	BM						
Géneros	H'	2,04	1,53	2,36	2,03	1,48	1,72	2,12	1,89	2,37	2,72	2,87	3,21	2,85	1,79
	J	0,42	0,40	0,54	0,44	0,30	0,35	0,43	0,41	0,57	0,84	0,70	0,74	0,77	0,51
Clases	H'	1,09	1,33	1,64	1,54	1,05	1,29	1,12	1,53	1,61	1,08	1,69	1,57	1,75	1,22
	J	0,22	0,34	0,38	0,33	0,21	0,26	0,23	0,33	0,39	0,33	0,41	0,36	0,47	0,35

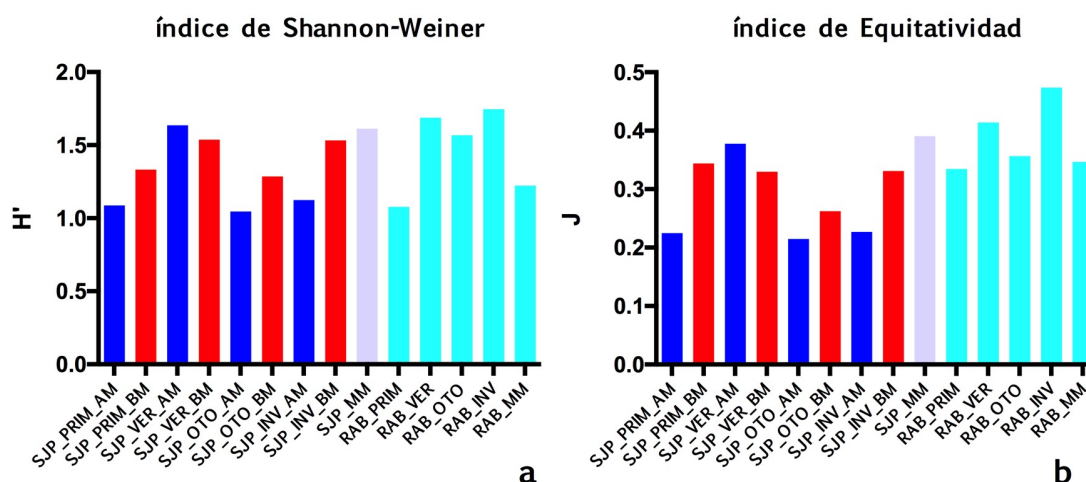
Figura 16. Índices de diversidad α de las muestras agrupadas por géneros: a) Shannon-Weiner y b) Equitatividad. En azul las muestras de SJP en marea alta, en rojo las de marea baja, en turquesa las muestras de RAB y en lila las de SJP de la muestra sin diferencia mareal.



Según este análisis la zona del río Tinto sujeta a influencia mareal tiene una diversidad de especies baja, siendo los valores normales de diversidad de especies de un ecosistema natural entre 2 y 3 (Carmona-Galindo y Carmona, 2013).

En general las muestras pertenecientes a La Rábida (con la excepción de RAB_MM) y la muestra de San Juan del Puerto correspondiente a la mínima diferencia mareal (MM) tienen unos valores normales. Los valores representados por el índice de Equitatividad (Fig. 16b), que varía entre 0 y 1, son más altos con respecto a las muestras de San Juan del Puerto, indicando que existe una mayor distribución de la abundancia de cada género en la Rábida, como era de esperar. Las muestras de la zona de San Juan del Puerto, sujetas a cambios físico-químicos cíclicos marea-dependientes, tienen menos diversidad con respecto a las muestras recogidas en la zona de La Rábida, que es menos variable. El análisis de diversidad α a nivel de clase (Fig. 17) no muestra diferencias significativas entre las muestras de San Juan del Puerto y la Rábida.

Figura 17. Índices de diversidad α de las muestras agrupadas por clases: a) Shannon-Weiner y b) Equitatividad. En azul las muestras de SJP en marea alta, en rojo las de marea baja, en turquesa las muestras de RAB y en lila las de SJP de la muestra sin diferencia mareal.



La mayoría de las muestras de marea baja muestran mayor diversidad que las de marea alta. El índice de Equitatividad muestra la misma tendencia. En este caso las muestras de marea alta tienen una diversidad representada mayoritariamente por las Alpha y las Gammaproteobacterias.

La diversidad β de acuerdo a Whittaker, describe las diferencias entre muestras basándose en la composición de los taxones y su abundancia relativa.

Los índices β obtenidos (Tab. 12) nos indican que las muestras recogidas en San Juan del Puerto a alta y baja marea son más parecidas entre sí, compartiendo un mayor número de géneros y que las más diversas, como era de esperar, son las de la marea baja de San Juan del Puerto y las de la Rábida.

Tabla 12. Índices de diversidad β de especies compartidas.

Índice de Whittaker	
MA-MB	34
MA-RAB	88
MB-RAB	94

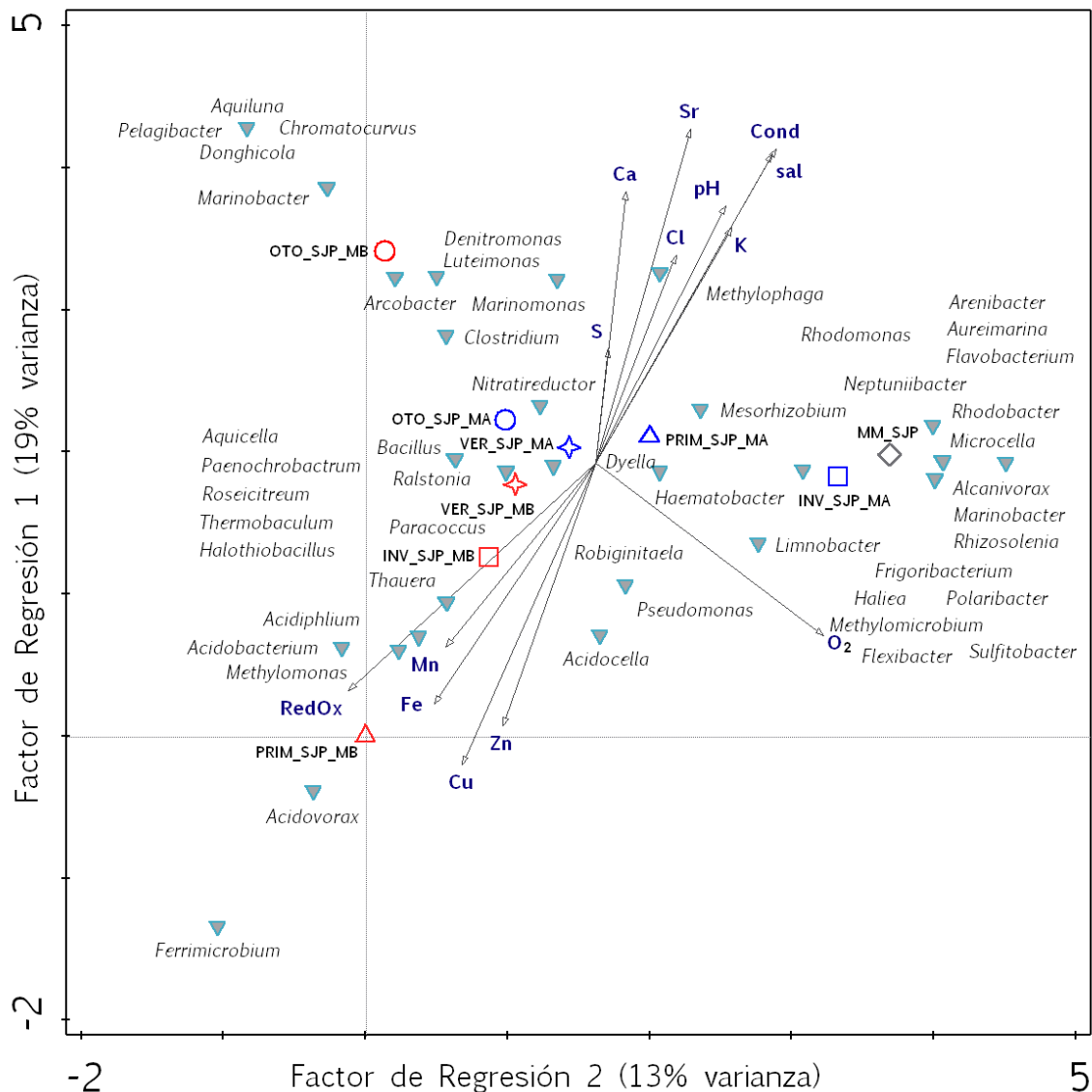
4.1.6 RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS Y COMUNIDAD BACTERIANA

Se realizó un Análisis de Correspondencia Canónica con el objetivo de integrar los parámetros físico-químicos registrados con los resultados procedentes del estudio de diversidad biológica, y de observar la distribución de las muestras integrando las distintas variables ambientales (Fig. 18). Es de destacar la estrecha correlación entre los microorganismos acidófilos, detectados fundamentalmente en las muestras de marea baja de San Juan del Puerto y la presencia de metales. Así mismo se aprecia que la

diversidad de las muestras de marea alta es algo más dispersa, aunque muestra una importante correlación con las variables relacionadas con la influencia oceánica. Se observa como microorganismos de los géneros *Ferrimicrobium*, *Acidiphilium*, *Acidovorax*, *Acidobacterium* y *Acidocella* tienen una estrecha correlación con los metales Fe, Zn, Cu, Co, Ni y Mg, mientras que, en el otro extremo de la gráfica, con las flechas que apuntan en la dirección opuesta se encuentran junto con el aumento de parámetros tal y como pH, salinidad, conductividad, el Cl y el K, la presencia de géneros típicos de aguas oceánicas, como *Polaribacter*, *Arcobacter*, *Marinomonas*, *Marinobacter*, *Limnobacter*.

Estos datos demuestran que la diaria alternancia de las condiciones físico-químicas dependientes de la marea lleva consigo una variación en las poblaciones de la comunidad bacteriana en San Juan del Puerto.

Figura 18. Análisis de correspondencia de la diversidad microbiana y las variables físico-químicas de las muestras de San Juan del Puerto obtenidas a alta y baja marea en distintas estaciones del año.



4.2 IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DE LOS AISLADOS MICROALGALES

4.2.1 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MICROALGALES

En este apartado se describe la caracterización de seis aislados de microalgas procedentes de los diferentes muestreos realizados en San Juan del Puerto. El aislamiento y seguimiento de los cultivos se llevó a cabo según se describe en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La identificación se realizó a través de la amplificación del 18S rRNA tal y como se explica en el apartado 3.4.2 de la misma sección y por Microscopía óptica. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y se compararon con las depositadas en la base de datos EMBL⁶-GenBank mediante el programa BLAST y la base de datos SILVA, y los árboles filogenéticos se construyeron según el método *neighbour-joining*.

De los aislados, cinco pertenecen al filo *Chlorophyta* (SJP_EBP_1, SJP_EAP_2, SJP_EBO_3, SJP_EBO_4 y SJP_EBI_5) y el aislado SJP_EAI_6 al filo *Rhodophyta*. Las clorofitas se aislaron en medio BG11 a 20 °C y se cultivaron a pH7 y a pH4, mientras que la rodofita se aisló en medio L1 a 20 °C y pH7.

Se analizarán en los siguientes párrafos los resultados relativos a la observación microscópica y al crecimiento (la tasa de crecimiento μ^7 y tiempo de duplicación td^6) de cada uno de los aislados junto con los datos obtenidos por el análisis filogenético.

⁶ European Molecular Biology Laboratory

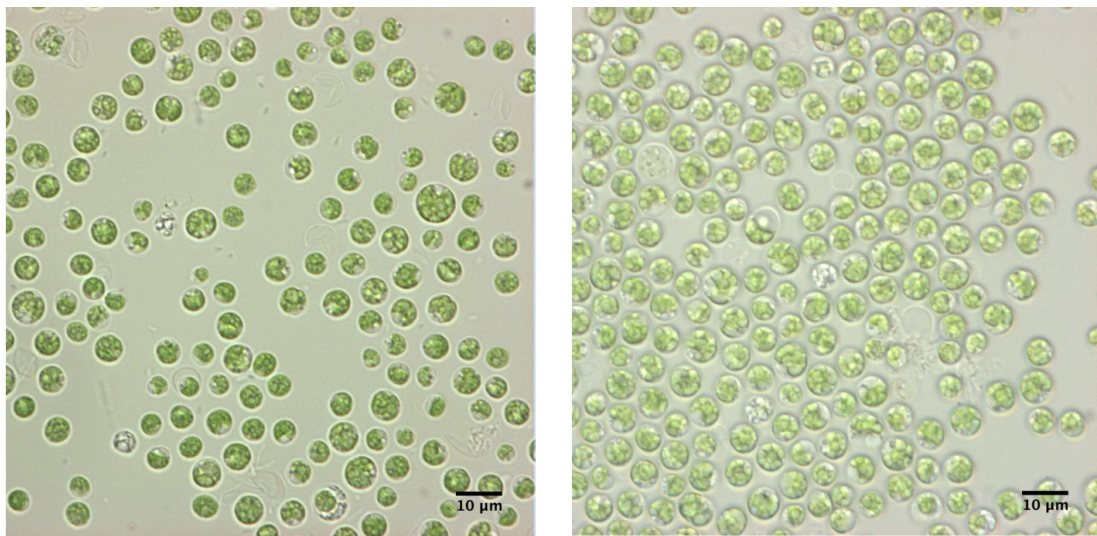
⁷ Calculado en el día 10

4.2.1.1 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBP_1

4.2.1.1.1 Morfología y condiciones de crecimiento

SJP_EBP_1 fue aislado del muestreo de primavera durante la marea baja. El cultivo se cultivó a pH7 (Fig. 19a) y a pH4 (Fig. 19b), está formado por células verdes de forma esféricas que no poseen flagelo y no forman cenobios. El tamaño de las células a los dos pH, se encuentra entre 2 y 4 μm de diámetro (Fig. 20a).

Figura 19. Micrográficas del aislado SJP_EBP_1 a) a pH7 y b) a pH4 en campo claro con objetivo 63X.

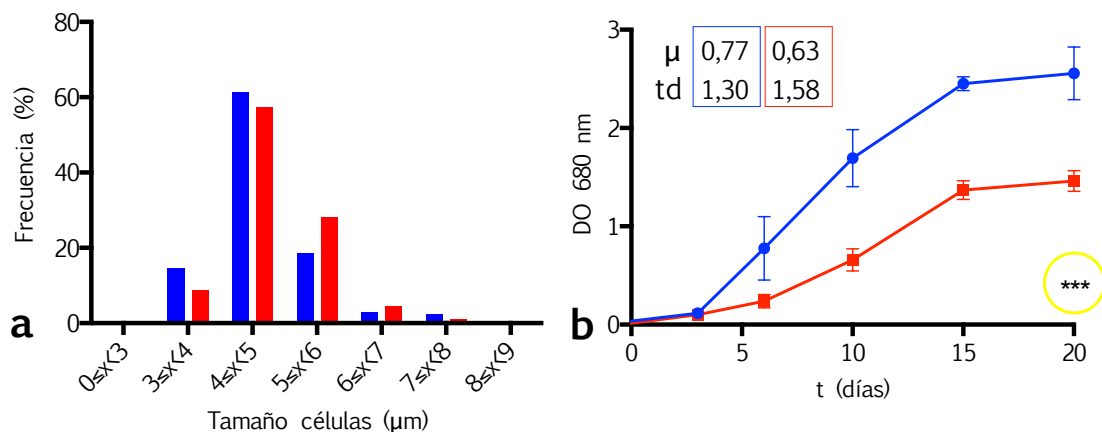


a

b

La tasa de crecimiento de SJP_EBP_1 ha sido calculada a partir de la pendiente de la recta en escala logarítmica obtenida de la curva de crecimiento mediante la medida de la DO a 680 nm frente al tiempo. SJP_EBP_1 muestra una tasa de crecimiento en fase exponencial entre 0,60 y 0,80 a pH4 y pH7 respectivamente.

Figura 20. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EBP_1 a pH7 (en azul) y a pH4 (en rojo); b) curva de crecimiento a pH7 (azul) y a pH4 (rojo). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; t_d =tiempo de duplicación (días).

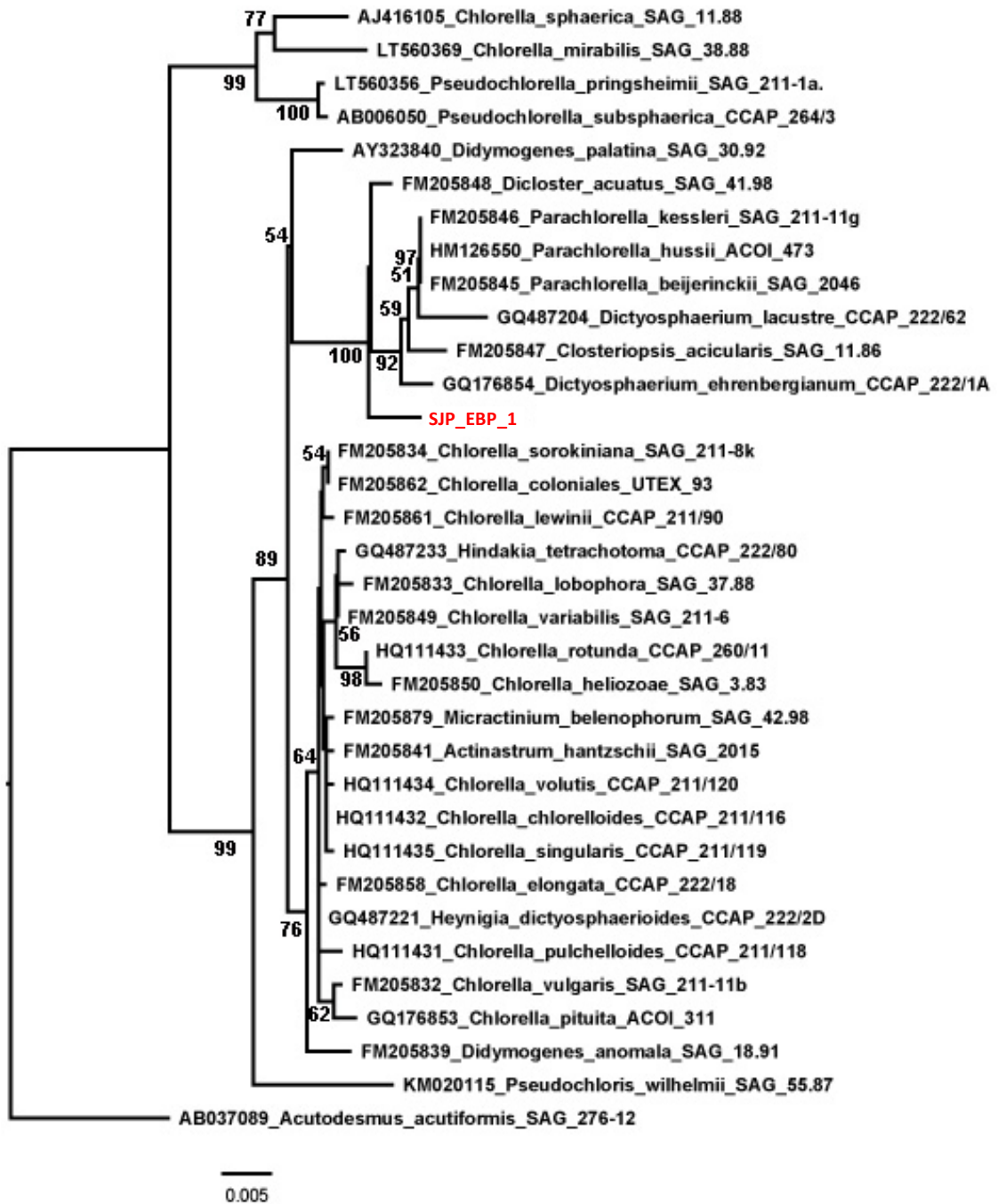


El crecimiento fue mayor a pH7 llegando a una DO de 2,5 a los 10 días frente a pH 4 que se alcanzó para el mismo tiempo una DO de 1,2. (Fig. 20b) por lo ue se puede concluir que su pH óptimo de crecimiento es de 7. Este dato fue confirmado por un análisis ANOVA bidireccional ($p \leq 0,001$).

4.2.1.1.2 Taxonomía

Los resultados obtenidos mostraron los dos grandes clados soportados por un bootstrap del 89%. Desde el punto de vista taxonómico la secuencia del 18S rRNA del aislado SJP_EBP_1 (Fig. 21) mostró un alto porcentaje de similitud (soportado por un bootstrap del 100%) con las secuencias publicadas de otras especies pertenecientes al clado *Parachlorella* (Krienitz y col., 2004) aunque como no se puede asignar a ninguno de los géneros incluidos de este clado, se requerirán estudios complementarios para determinar su adscripción definitiva. Se ha asignado provisionalmente al género *Parachlorella*, ya que es al que morfológicamente más parecido tiene. La taxonomía de las especies similares a *Chlorella* es muy compleja Škaloud y col., 2014; Škaloud y col., 2016). La utilización de datos de secuencia del gen 18S rRNA reveló que la sola morfología de estos organismos oculta una extensa diversidad y lejanía entre especies tradicionalmente adscritas a *Chlorella* sp. Debido a estos estudios filogenéticos, la clasificación actual de la familia Chlorellaceae es diferente de la clásica encontrándose formada por dos linajes, el clado *Chlorella* y el clado *Parachlorella*. Ambos clados contienen microalgas con morfologías que difieren de la considerada típica de *Chlorella* (Krienitz y col., 2004). El clado *Parachlorella* actualmente comprende 10 géneros (Krienitz y col., 2004), que forman parte principalmente del plancton de varios cuerpos de agua dulce. Las especies son morfológicamente muy diferentes y a pesar de los estudios realizados, existe una gran controversia entre los resultados obtenidos por las técnicas tradicionales principalmente morfológicas y las obtenidas por métodos moleculares (Krienitz y Bock, 2012; Škaloud y col., 2016). Así, por ejemplo, los análisis filogenéticos realizados con *Dicloster acuatatus* lo incluyen claramente dentro del clado *Parachlorella* si bien morfológicamente posee una estructura en estrella con extremos puntiagudos que recuerda a algunas especies dentro de la familia Scenedesmaceae. Por su lado *Dictyosphaerium* forma colonias constituidas por 4 a 64 células embebidas en una estructura común (Algaebase: <http://www.algaebase.org/>).

Figura 21. Afiliación filogenética del aislado SJP_EBP_1 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.

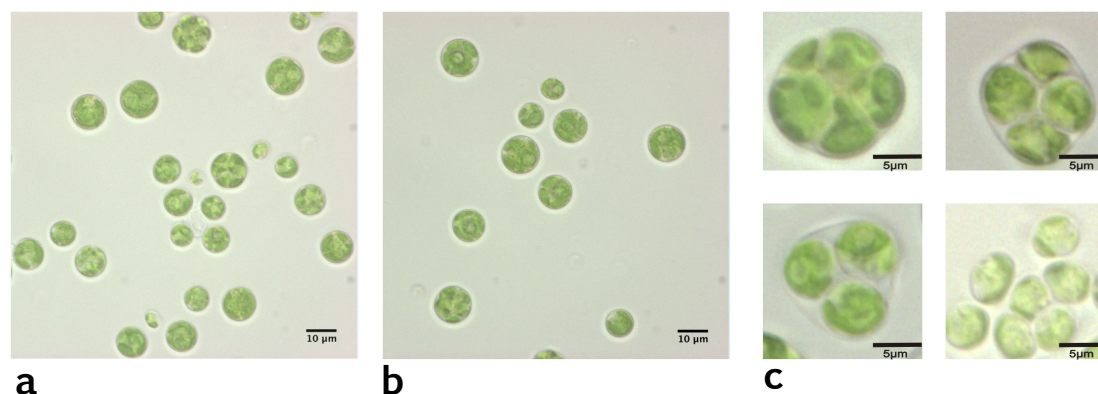


4.2.1.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBP_2

4.2.1.2.1 Morfología y condiciones de crecimiento

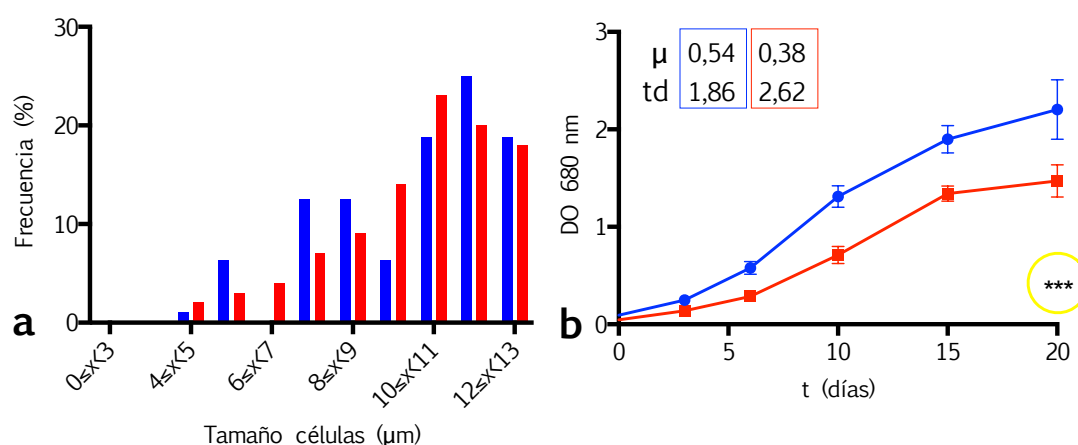
SJP_EAP_2 se aisló a partir del muestreo de marea alta en primavera. Las células (Fig. 22a y b) son esféricas, verdes, inmóviles y con diámetros entre 8 y 11 μm (Fig. 23a). En el detalle que se muestra en la figura 22c se observan las autoesporas globulares de 5-7 μm de diámetro.

Figura 22. Micrografías del aislado SJP_EAP_2 cultivado a) a pH7 y b) a pH4 en campo claro con objetivo 63X. c) Detalle de las micrografías.



El cultivo muestra una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, $p \leq 0,001$) en el crecimiento entre pH7 con un μ de 0,5 y pH4 ($\mu=0,4$), con tiempos de duplicación de 1,9 días para el aislado cultivado a pH7 y de 2,6 días para el de pH4 (Fig. 23b).

Figura 23. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EAP_2 a pH7 (en azul) y a pH4 (en rojo); b) curva de crecimiento a pH7 (azul) y a pH4 (rojo). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; td=tiempo de duplicación (días).

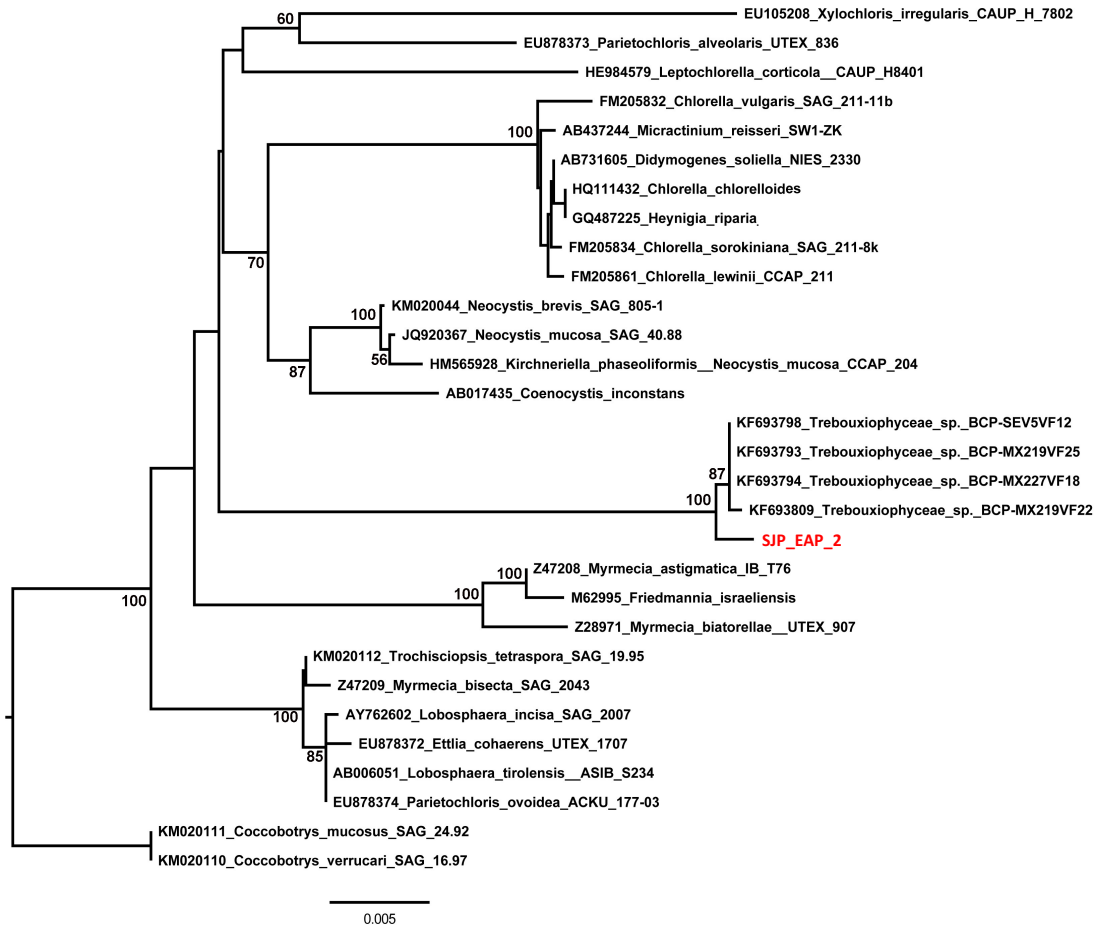


4.2.1.2.2 Taxonomía

Para caracterizar taxonómicamente esta microalga, se estudió su morfología en microscopía de campo claro y se llevó a cabo el análisis filogenético basado en la secuencia del gen 18SrRNA. SJP_EBP_2, según el análisis efectuado, pertenece a una

especie no descrita cuya afiliación más próxima es a nivel taxonómico de la clase *Trebouxiophyceae*. Los resultados moleculares revelaron una posición distinta del alga dentro del clado *Trebouxiophyceae* sp., con un bootstrap del 100%. Los microorganismos más cercanos se han propuesto como un linaje distinto dentro de esta clase (Fig. 24).

Figura 24. Afiliación filogenética del aislado SJP_EAP_2 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.

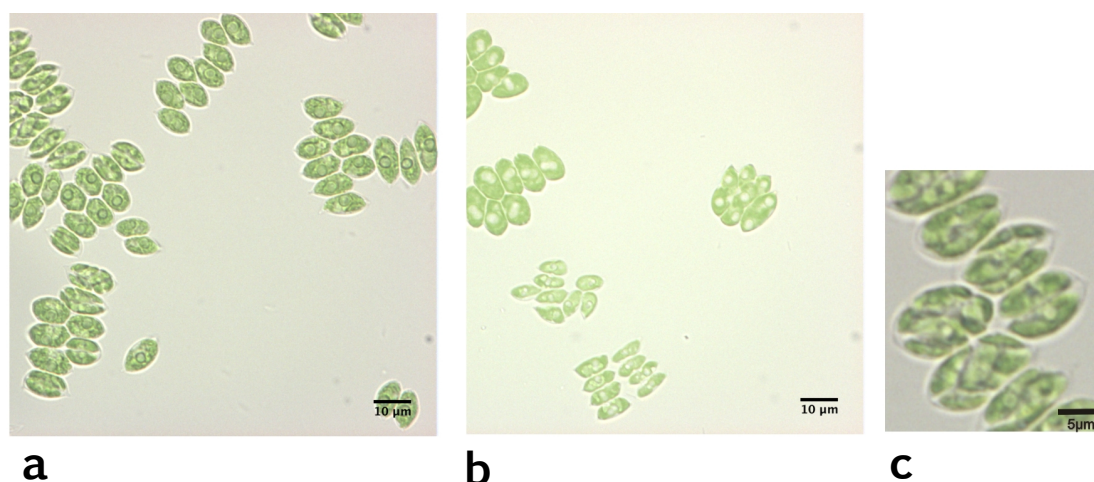


4.2.1.3 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBO_3

4.2.1.3.1 Morfología y condiciones de crecimiento

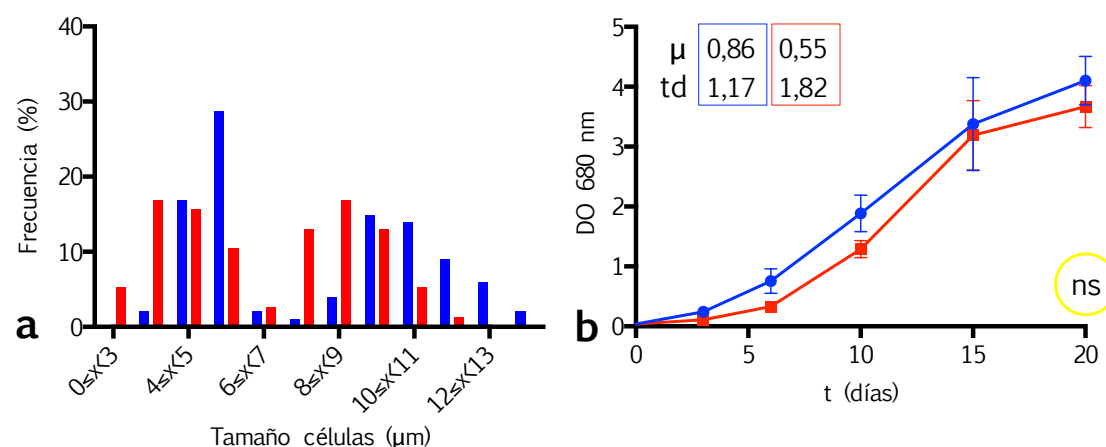
SJP_EBO_3 fue aislado a partir del muestreo de otoño durante la marea baja. Las células del aislado son elipsoidales con los polos truncados dispuestas linealmente o de forma alterna formando cenobios tetracelulares u octocelulares (Fig. 25a, b y c).

Figura 25. Micrografías del aislado SJP_EBO_3 cultivado a) a pH7 y b) a pH4 en campo claro con objetivo 63X. c) Detalle de las micrografías, células en división.



No se observaron diferencias en el tamaño de las células entre ambos pHs. El tamaño celular se encuentra entre 5 y 7 µm de longitud y entre 5 y 8 µm de ancho (Fig. 26a). La tasa de crecimiento al 6º día fue de 0,30 y 0,80 a pH4 y pH7, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los cultivos en los dos pHs (Fig. 26b).

Figura 26. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EBO_3 a pH7 (en azul) y a pH4 (en rojo); b) curva de crecimiento a pH7 (azul) y a pH4 (rojo). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; td =tiempo de duplicación (días).

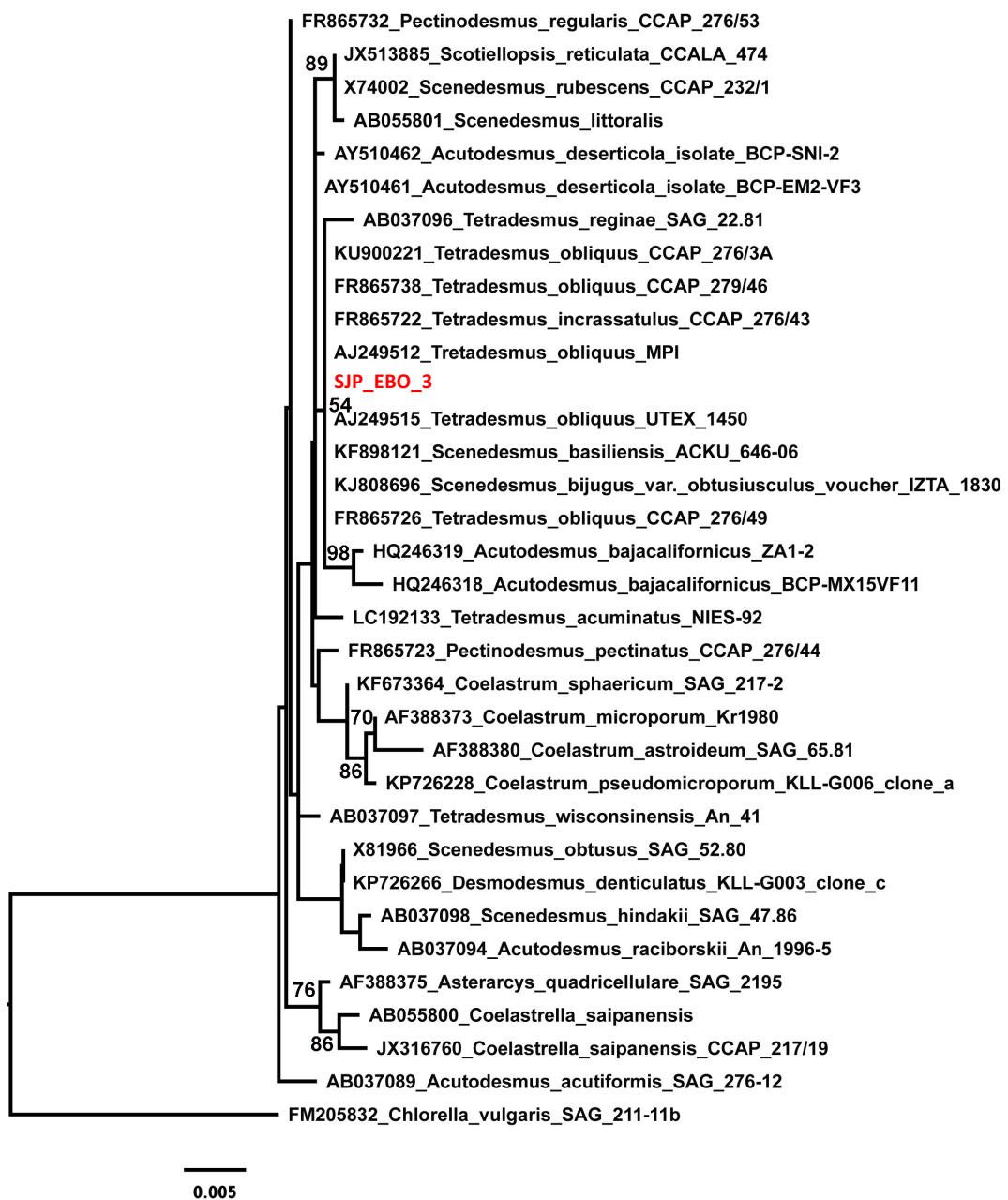


4.2.1.3.2 Taxonomía

En el árbol filogenético (Fig. 27) el aislado aparece junto con varias cepas de *Tetrademus obliquus*, *T. incrassatulus*, *Scenedesmus bijugus* y *S. basiliensis*. Se ha

propuesto que estas especies se consideren aislados de una misma especie: *T. obliquus* (Wynne y Hallan, 2016). *Tetrademus* es un género de algas verdes que fue descrito por Smith (1913), basado en la única especie *T. wisconsinensis* G. M. Smith. En las últimas décadas ha habido mucha controversia porque organismos adscritos al género *Tetrademus* habían sido asignados a los géneros *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Acutodesmus*. Actualmente, muchas de las especies adscritas originalmente a estos géneros se encuentran incluidas en el género *Tetrademus* (Smith, 1913; Eberhard y col., 2013; Wynne y Hallan, 2016).

Figura 27. Afiliación filogenética del aislado SJP_EBO_3 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.

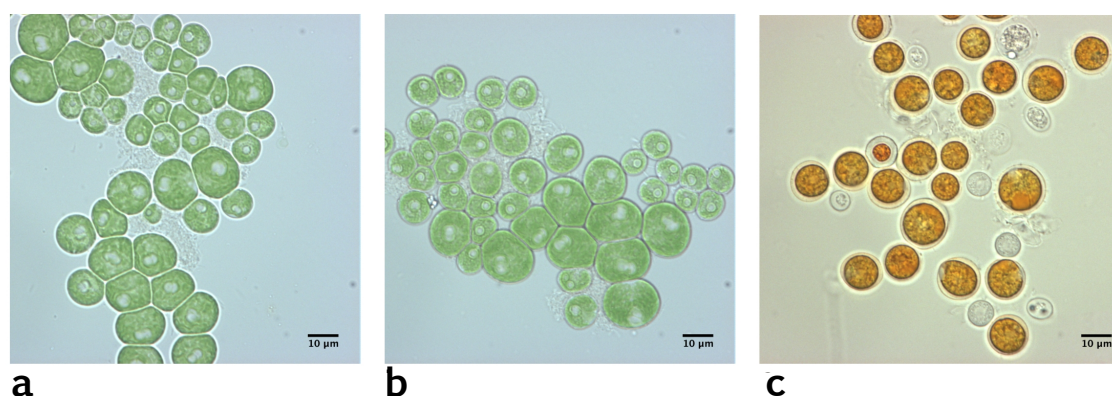


4.2.1.4 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBO_4

4.2.1.4.1 Morfología y condiciones de crecimiento

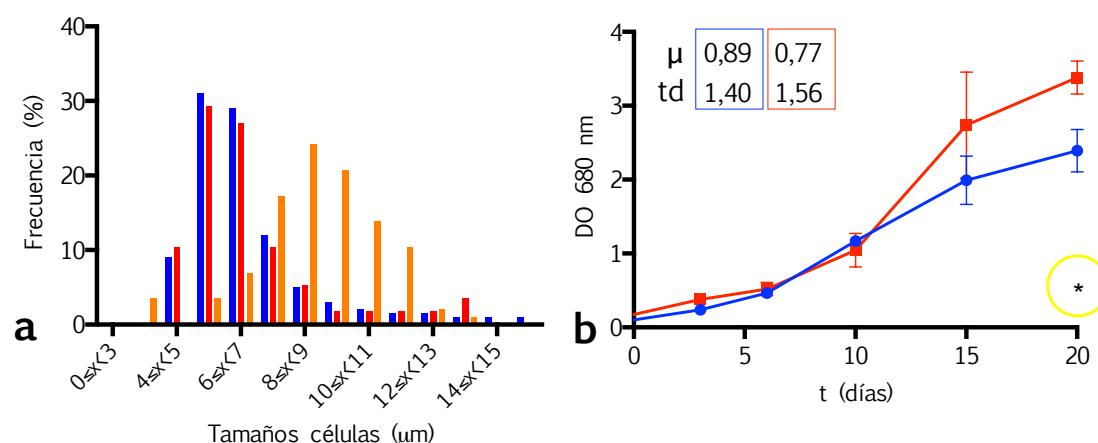
SJP_EBO_4 fue aislado a partir del muestreo de otoño en marea baja. Las células poseen morfología esférica, inmóviles y de color verde claro observándose el pirenóide, como en el caso de *T. obliquus* (Fig. 28a y b). Además de los carotenoides primarios (componentes funcionales y estructurales del aparato fotosintético), los carotenoides secundarios se acumulan como respuesta al estrés tal y como la falta de nutrientes, alta salinidad, deshidratación, etc. (Lemoine y Schoefs, 2010).

Figura 28. Micrografías del aislado SJP_EBO_4 cultivado a) a pH7 y b) a pH4 en campo claro con objetivo 63X. c) Detalle de las micrografías, autoesporas.



En el cultivo SJP_EBO_4, a partir de los 15 días de incubación, empiezan a aparecer células de color naranja-marrón, presumiblemente ricas en estos pigmentos con la pared engrosada (Fig. 28c) y un tamaño aumentado de 4-5 µm a 10-11 µm (Fig. 29a)

Figura 29. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EBO_4 a pH7 (en azul) y a pH4 (en rojo); b) curva de crecimiento a pH7 (azul) y a pH4 (rojo). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; t_d =tiempo de duplicación (días).



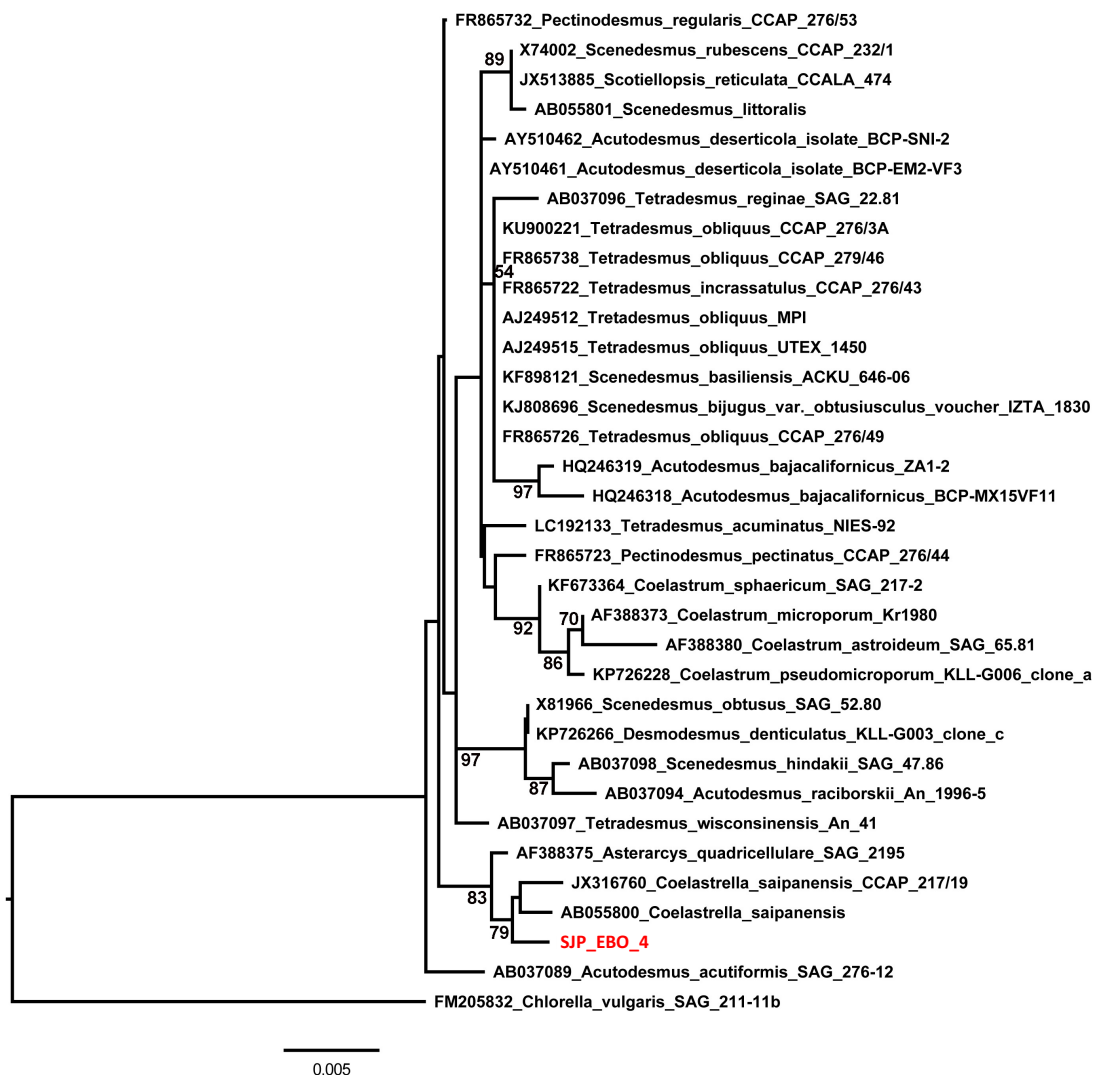
No se observaron diferencias de tamaño celular relacionadas con el pH, obteniéndose valores entre 6-7 µm de diámetro (Fig. 29a) para ambas muestras, mientras se observa una diferencia en el tamaño entre las muestras de cultivos frescos (Fig. 28 a y b) y la

del cultivo en fase estacionaria (Fig. 28c) que tienen un tamaño medio de diámetro alrededor de 10 μm . Al 6º día de cultivo, SJP_EBO_4 alcanzó la fase exponencial con una tasa de crecimiento de 0,77 y 0,89 a pH4 y pH7, respectivamente (Fig. 29b). Por las curvas de crecimiento obtenidas se observa que este aislado tiene un crecimiento parecido a ambos pHs, hasta llegar a las dos semanas, donde parece que el crecimiento a pH4 es ligeramente mayor con respecto a pH7 ($p \leq 0,05$).

4.2.1.4.2 Taxonomía

SJP_EBO_4 aparece próximo a otras especies de *Coelastrella saipanensis* (Fig. 30) si bien en una rama diferente soportada por un bootstrap del 79% por lo que podría tratarse de una especie diferente. A este mismo género corresponden otras especies en las que ha descrito la producción de carotenoides secundarios responsables del cambio de coloración de los cultivos (Abe y col., 2004; Abe y col., 2007), que también se observa en nuestro aislado.

Figura 30. Afiliación filogenética del aislado SJP_EBO_4 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.



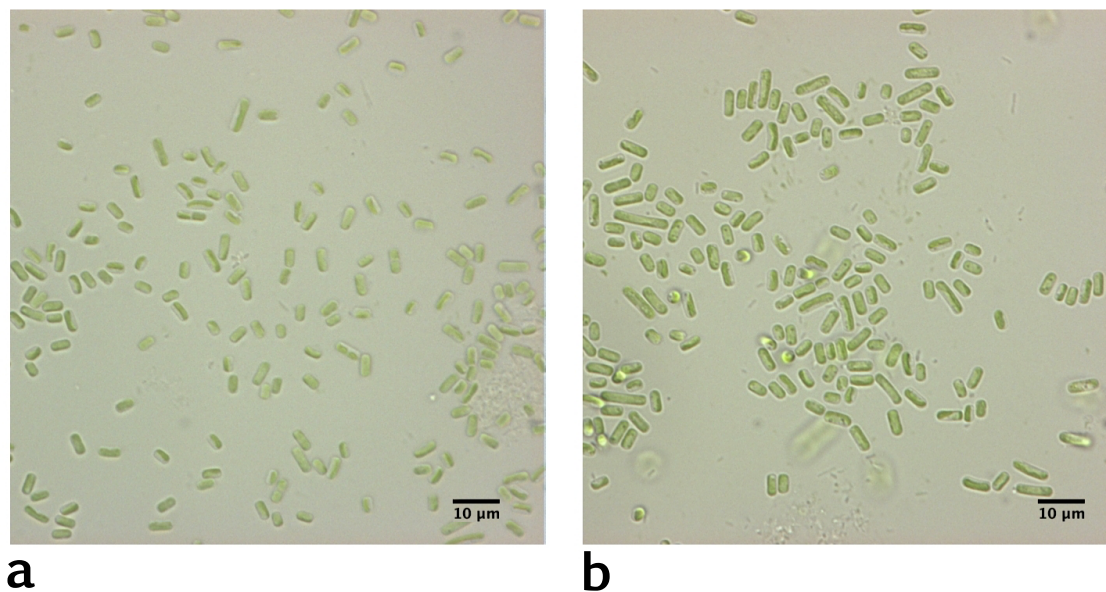
4.2.1.5 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBI_5

4.2.1.5.1 Morfología y condiciones de crecimiento

SJP_EBI_5 fue aislado a partir del muestreo de invierno en marea baja.

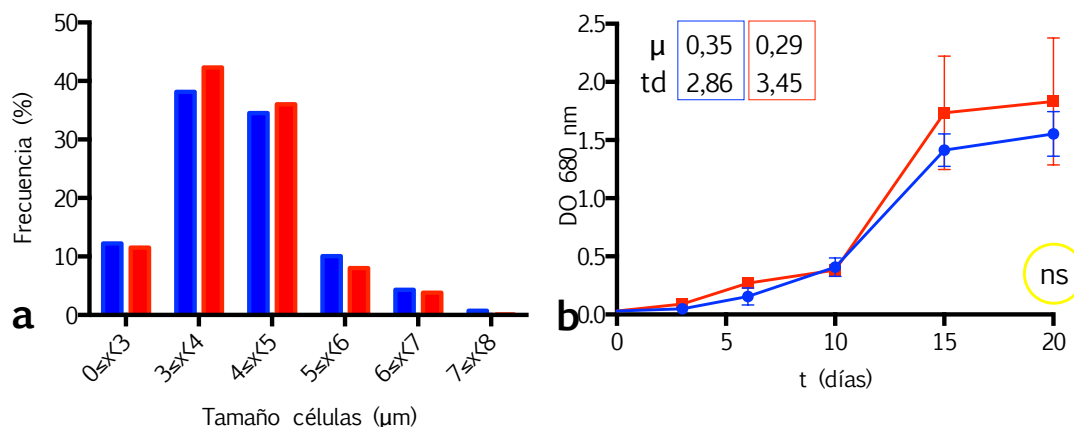
Las células presentaron una forma bacilar, de color verde claro y de disposición unicelular (Figs. 31a y b).

Figura 31. Micrografías del aislado SJP_EBI_5 a) a pH7 y b) a pH4 en campo claro con objetivo 63X.



Las células miden entre 3 y 4 µm de largo (Fig. 32a) y 2 µm de ancho (medida no mostrada en el histograma). SJP_EBI_5 presentó una tasa de crecimiento de 0,13 y 0,16 a pH4 y pH7, respectivamente al 6º día, en contraste con el tiempo de duplicación, que fue superior a pH4 que a pH7, siendo de 2,9 y 3,5 días, respectivamente (Fig. 32b).

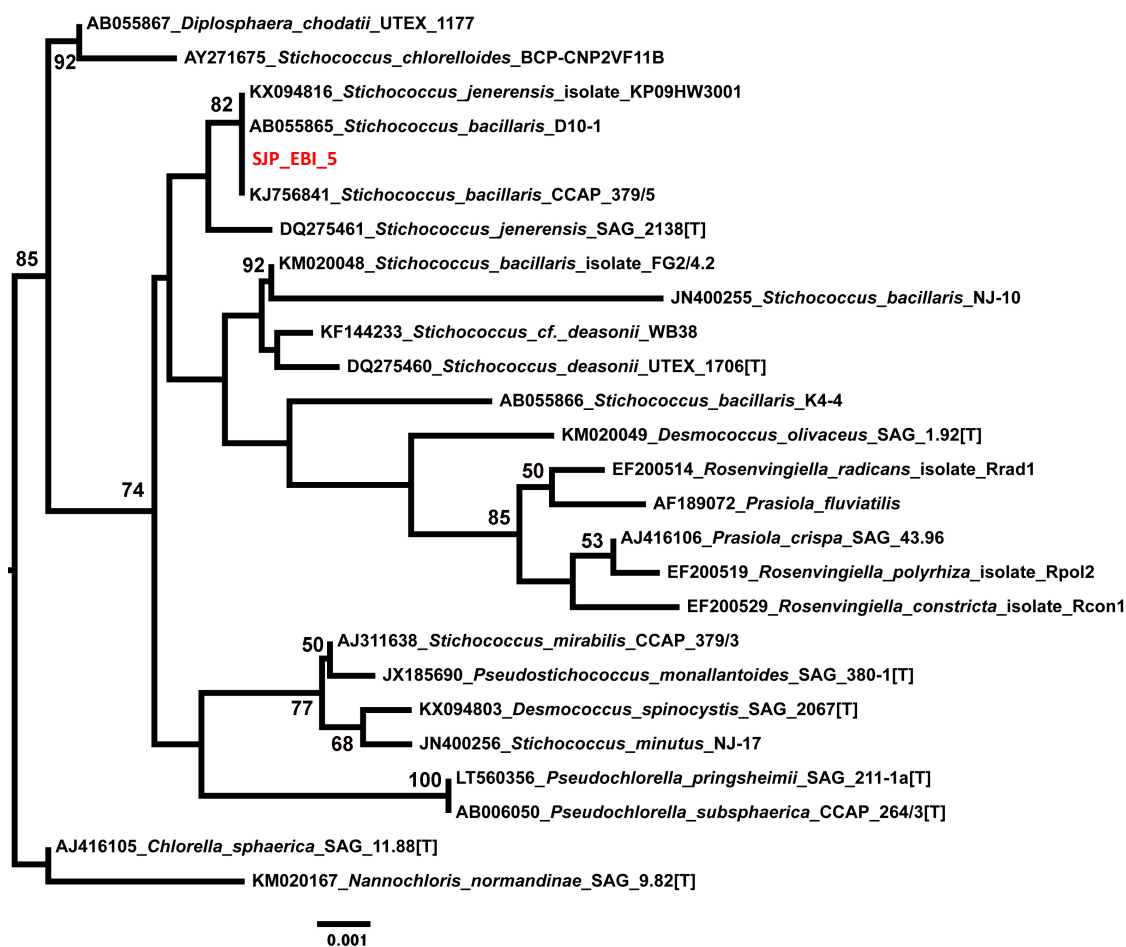
Figura 32. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EBI_5 a pH7 (en azul) y a pH4 (en rojo); b) curva de crecimiento a pH7 (azul) y a pH4 (rojo). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; t_d =tiempo de duplicación (días).



4.2.1.5.2 Taxonomía

SJP_EBP_5 se ha asignado al género *Stichococcus* (soportado por un bootstrap del 82%), clorofita de la clase *Trebouxiophyceae*, pudiendo estar relacionado con las especies *S. bacillaris* o *S. jenerensis*. Según lo que se ha descrito en la bibliografía (Pollio y col., 1997; Sivakumar y col., 2014) sobre la morfología de estas dos especies y los estudios de microscopia óptica realizados, éste podría asignarse a la especie *S. bacillaris* (Fig. 33). Este género se ha encontrado en estudios previos sobre la diversidad eucariótica del río Tinto (Aguilera y col., 2007b).

Figura 33. Afiliación filogenética del aislado SJP_EBI_5 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.



4.2.1.6 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO SJP_EBO_6

4.2.1.6.1 Morfología y condiciones de crecimiento

SJP_EBO_6 fue aislado a partir del muestreo de invierno en marea alta. El aislado presenta células esféricas de tamaño muy homogéneo de unas 5-6 μm de diámetro de color rosado agregadas en un mucílago (Figs. 34a y b y 35a). Muestra una tasa de crecimiento más baja con respecto a los otros cultivos aislados con un valor de 0,35 y un tiempo de duplicación de dos días (Fig. 35b). Este aislado no se cultivó a pH4 debido al alto contenido en sales contenidas en el medio L1.

Figura 34. Micrografías a) y b) en campo claro con objetivo 63X;

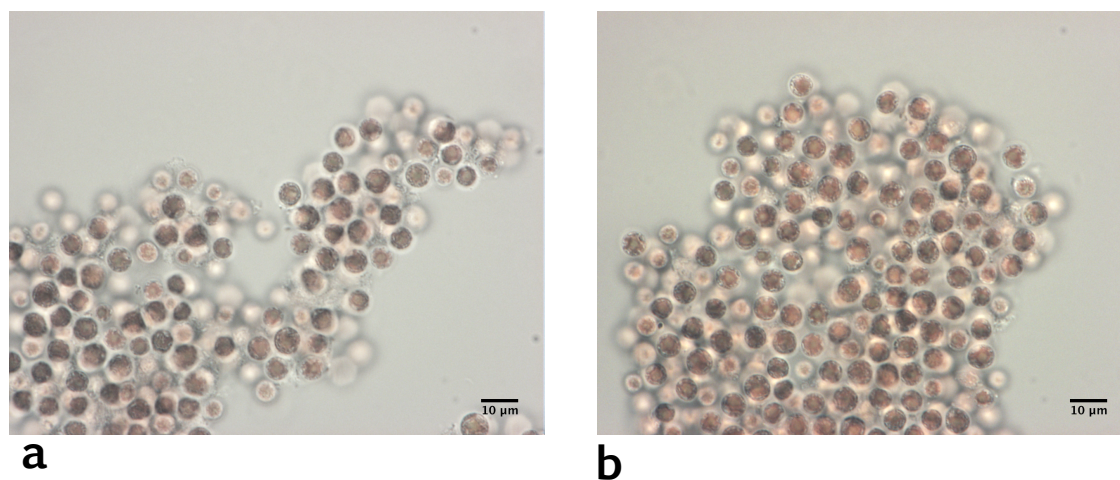
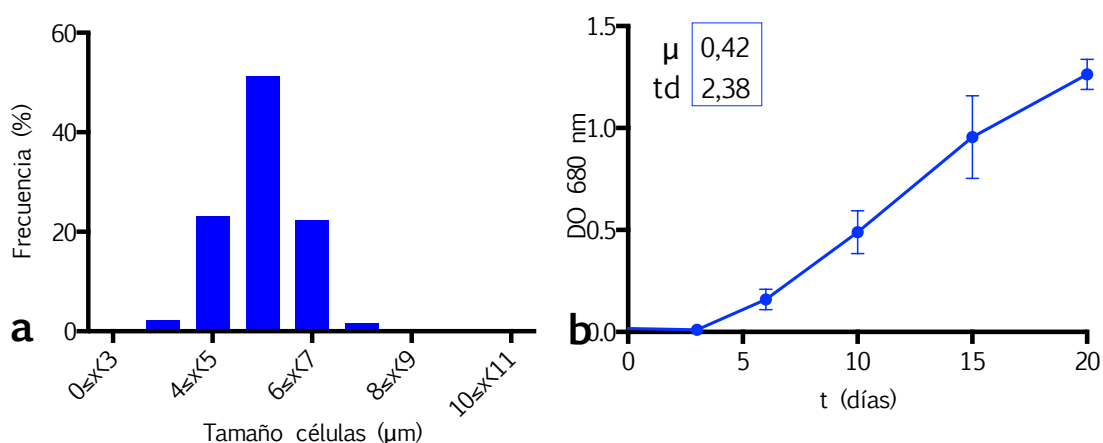


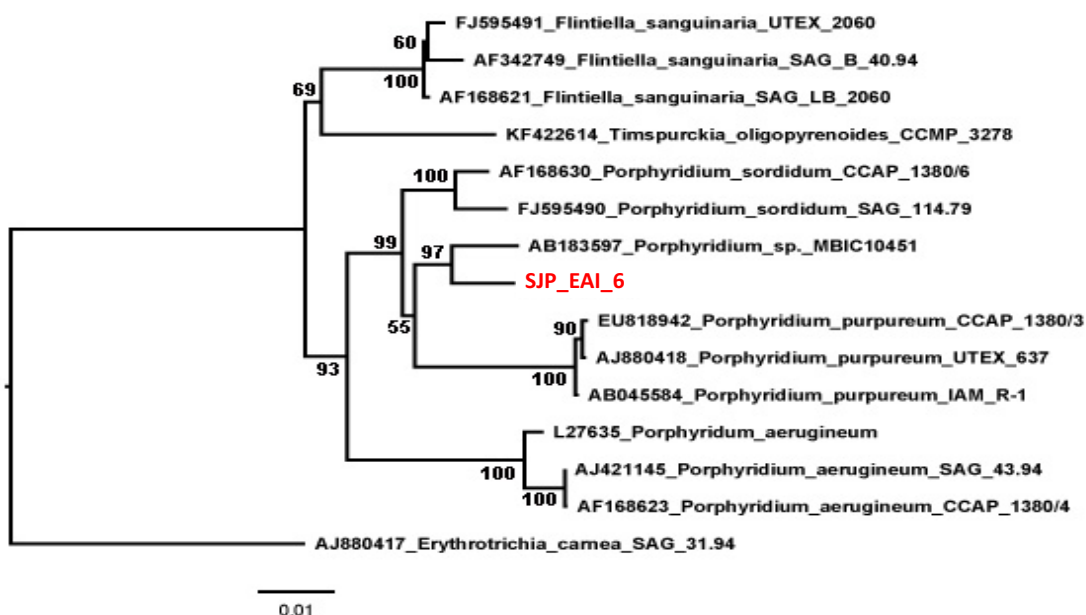
Figura 35. a) Histograma con la distribución de la frecuencia de los tamaños de los diámetros del aislado SJP_EBO_6 a pH7 (en azul); b) Curva de crecimiento a pH7 (en azul). En el círculo amarillo, el nivel de significación de la ANOVA realizada. μ =tasa de crecimiento; t_d =tiempo de duplicación (días).



4.2.1.6.2 Taxonomía

El aislado SJP_EAI_6 se clasificó dentro del género *Porphyridium* sp. (bootstrap del 93%), perteneciente al phylum de las *Rhodophyta*, a la clase *Bangiophyceae*, si bien se diferencia de los aislados pertenecientes a *P. sordidum* y *P. purpureum* (Fig. 36). Las células de este aislado se encuentran encapsuladas en un polisacárido al igual que en otras especies de este género, que ha sido estudiado ampliamente debido a sus posibles aplicaciones médicas e industriales tal y como han sido descritas por otros autores para las especies *P. cruentum* (Gasljevic y col., 2009) y *P. sordidum* (Raposo y col., 2013).

Figura 36. Afiliación filogenética del aislado SJP_EAI_6 según el gen amplificado 18SrRNA. No se han incluido valores de *bootstrap* inferiores al 50%.



En la tabla 13 se muestra la adscripción filogenética de los cultivos aislados. Varios de ellos, podrían corresponder a nuevos géneros y especies: SJP_EBP_2 se caracterizó a nivel taxonómico como miembro de la clase *Trebouxiophyceae* y los aislados SJP_EBP_1, SJP_EBO_4 y SJP_EAI_6 hasta nivel de género a *Parachlorella* sp., *Coelastrella* sp. y a *Porphyridium* sp., respectivamente. Tres de las clorifitas pertenecen a la clase *Trebouxiophyceae* (SJP_EBP_1, SJP_EAP_2 y SJP_EBI_5), mientras que SJP_EBO_3 y SJP_EBO_4 son de la clase *Chlorophyceae*. La única rodofita es el aislado SJP_EAI_6, de la clase *Bangiophyceae* (Tab. 13).

Tabla 13. Afiliación filogenética de los cultivos aislados. Nomenclatura: SJP (San Juan del Puerto); E=Eucariota; A=marea alta; B=marea baja; P=Primavera; O=otoño; I=invierno;

Aislado	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
SJP_EBP_1	<i>Chlorophyta</i>	<i>Trebouxiophyceae</i>	<i>Chlorellales</i>	<i>Chlorellaceae</i>	<i>Parachlorella</i>	ND
SJP_EAP_2	<i>Chlorophyta</i>	<i>Trebouxiophyceae</i>	ND	ND	ND	ND
SJP_EBI_5	<i>Chlorophyta</i>	<i>Trebouxiophyceae</i>	<i>Microthamniales</i>	<i>Prasiolaceae</i>	<i>Stichococcus</i>	<i>S. bacillaris</i>
SJP_EBO_3	<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Sphaeropleales</i>	<i>Scenedesmaceae</i>	<i>Tetrademus</i>	<i>T. obliquus</i>
SJP_EBO_4	<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Sphaeropleales</i>	<i>Scenedesmaceae</i>	<i>Coelastrella</i>	ND
SJP_EAI_6	<i>Rhodophyta</i>	<i>Bangiophyceae</i>	<i>Porphyridiales</i>	<i>Porphyridiaceae</i>	<i>Porphyridium</i>	ND

Entre los aislados cultivados a pH4 y a pH7, podemos observar como en el caso de *Parachlorella* sp., *Trebouxiophyceae* sp. y *Coelastrella* sp., exista una diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento a pH4 y a pH7, teniendo esta última mejor crecimiento a pH4 mientras que las otras dos a pH7. En cuanto a las tasas de crecimiento calculadas, los aislados *Coelastrella* sp., *T. obliquus*, y *Parachlorella* sp. a ambos a pH7, tienen los valores más altos asociados a un tiempo de duplicación entre 24 y 43h a los 10 días, mientras que el cultivo con la tasa inferior es de *S. bacillaris* a pH4. Algunos autores indican que la identificación de las microalgas verdes cocoides, al igual que en el caso de los cultivos *Parachlorella* sp., *Trebouxiophyceae* sp. y la clorofícea *Coelastrella* sp. aisladas en este estudio, es a menudo un desafío para los ecólogos y los taxónomos, debido a la escasez de caracteres fenotípicos utilizables para la clasificación y a la falta de información sobre las secuencias de DNA (Škaloud y col., 2016). Además, en la clase *Trebouxiophyceae* del filo *Chlorophyceae*, los datos moleculares han revelado un origen polifilético de géneros morfológicamente parecidos que indican una convergencia evolutiva hacia un determinado fenotipo; mientras que por otra parte, los análisis filogenéticos han mostrado estrechas relaciones entre microorganismos con morfología muy disímil, lo que demuestra que la evolución del fenotipo puede ser rápida y puede dificultar la clasificación de las microalgas pertenecientes a esta clase (Leliaert y col., 2012).

Las microalgas poseen un gran potencial biotecnológico, debido, entre otros factores, a su gran variabilidad inter e intra-específica y a su fácil cultivo a gran escala. Algunas de estas aplicaciones descritas en la literatura reciente en los géneros aislados en este trabajo son: en *Parachlorella* la producción de lípidos para obtención de biodiesel (Li y col., 2013; Ota y col., 2016); en *Tetrademus* sp. la producción de suplementos dietéticos (vitaminas A, C, E, β -caroteno), la producción de lípidos, antibióticos y antivirales (Ishaq y col., 2016) y su utilización para el tratamiento de aguas residuales (Safonova y col., 2004); en *Coelastrella* sp., su uso para el biomonitorio ambiental (Abe y col., 2004) y para la producción de pigmentos (Hu y col., 2013). *Stichococcus* sp. se ha utilizado para el tratamiento de aguas residuales (Safonova y col., 2004) y para la producción de lípidos (Sivakumar y col., 2014). *Porphyridium* sp. para la producción de exopolisacáridos con aplicación biomédica (Raposo y col., 2013; Raposo y col., 2015).

4.2.2 ENSAYOS DE APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS AISLADOS MICROALGALES

4.2.2.1 ESTUDIO DE TOLERANCIA FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METALES

Las microalgas representan la mayor parte de la biomasa en los océanos poseyendo un papel ecológico esencial en ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Como productores primarios constituyen un nivel trófico fundamental encontrándose en la base de la cadena alimenticia y participando activamente en el ciclo biogeoquímico del carbono, transformando la materia inorgánica en materia orgánica y contribuyendo a mantener la atmósfera tal como la conocemos hoy en día (Perales-Vela y col., 2006; Lesmana y col., 2009; Shanab y col., 2012). Dada su importancia, la presencia de cualquier compuesto tóxico en el medioambiente puede alterar la composición, la estructura y el funcionamiento del ecosistema (Kennish, 2002). Los metales constituyen un grupo de contaminantes comúnmente estudiados debido a su continua liberación en los ecosistemas acuáticos, su toxicidad, su bioacumulación y su biomagnificación en la cadena alimenticia. El origen de los mismos en el medioambiente puede ser de origen antrópico o natural siendo muy variados, encontrándose numerosos metales (Fe, Zn, Cu, Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, La, Li, V) metaloides (As, Te) y nanopartículas metálicas (Ag, Pt, TiO₂, ZnO, CeO₂, NiO, BaTiO₃, Y₂O₃, Al₂O₃) (Miazek, y col. 2015). En las microalgas, los metales, a pequeñas concentraciones, son indispensables para que las células realicen funciones celulares específicas. De esta forma son componentes esenciales de las proteínas que constituyen la cadena de transporte de electrones (Cu, Fe) y en el centro de reacción fotosintético (Mn) o son constituyentes de las vitaminas (Co) (Andersen, 2005). También sirven como cofactores para las enzimas que participan en la fijación del CO₂ (Zn en la anhidrasa carbónica) (Moroney y col., 2001), la transcripción del DNA (Zn en la RNA polimerasa), en la fijación de N₂ (Mo, Fe, V en la nitrogenasa) o en la reducción de nitratos (Mo en nitrato y Fe en nitrito reductasa) (Sunda, 2012). Sin embargo, las altas concentraciones de estos metales y otros metales pesados no esenciales (Hg, As, Cd, Pb, Cr) causan efectos perjudiciales en las células de las microalgas a distintos niveles. Entre los efectos observados se incluyen: reducción del crecimiento celular, reducción en el transporte electrónico fotosintético y de la fijación del carbono, inhibición de las enzimas intracelulares debido al desplazamiento de metales esenciales, disminución en la entrada de nutrientes y desarrollo morfológico anormal (Miazek y col., 2015). Además, siendo las microalgas uno de los grupos básicos en la cadena trófica que se ve afectado por la contaminación por metales, proporciona información importante para predecir el impacto ambiental de la contaminación. En este capítulo se ha estudiado: a) la tolerancia de las seis microalgas aisladas a cinco concentraciones de los metales Cd, Cu, Fe y Pb según se especifica en el apartado 3.5.3.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose las curvas de crecimiento donde se observa el efecto de los distintos metales dependiendo de su concentración en el medio; b) los efectos de ciertas concentraciones de metales sobre la morfología celular

de las microalgas aisladas observados mediante microscopía óptica y c) la potencial capacidad biorremediadora de los aislados mediante la evaluación de la disminución de la concentración del metal en el medio de cultivo. Los resultados se han agrupado por metales para dar una visión general de su influencia sobre los diferentes aislados. Cada apartado se subdivide en dos secciones: **crecimiento**, en la que se exponen los resultados obtenidos a partir del análisis de los porcentajes de inhibición de los cultivos a ambos pHs para cada metal al cabo de 15 días del inicio del experimento. Se realizó, para todas las muestras, el análisis estadístico ANOVA, cuyos resultados se detallan en el anexo II, en las figuras 1 a 8. Se calculó la Concentración Inhibitoria media (IC_{50}), que representa la concentración del metal que reduce la densidad celular de la población a la mitad, frente a la del control. Los parámetros evaluados permiten estimar la diferencia en el crecimiento de las microalgas con respecto al control y el nivel de tolerancia a cada metal para su posible aplicación en biorremediación. **Observación microscópica:** a través de Microscopía óptica en campo claro, se observaron los efectos que la exposición a los diferentes metales ejerce sobre los cultivos de las microalgas y que se pueden resumir en a) efectos sobre la agregación de las células (AC) y formación de mucílago extracelular (ME), b) variaciones morfométricas (VM) y c) fenómenos de adsorción (AD). Las imágenes de los cultivos control utilizados son: para *Parachlorella* sp. las figuras 19a y 19b (pH7 y pH4 respectivamente), para *Trebouxioophyceae* sp. las figuras 22a (pH7) y 22b (pH4), para *T. obliquus* las figuras 25a (pH7) y 25b (pH4), para *Coelastrella* sp. las figuras 28a (pH7) y 28b (pH4), para *S. bacillaris* las figuras 31a (pH7) y 31b (pH4) y para *Porphyridium* sp. la figura 34a. Al final de este capítulo se muestra un análisis preliminar sobre el posible potencial biorremediador de las microalgas aisladas a través de la determinación de la tasa de retirada del metal (E) por las células en función de la cantidad del metal en el medio.

4.2.2.1.1 Ensayo de tolerancia frente a cadmio

El cadmio es un metal pesado ampliamente distribuido en la corteza terrestre donde puede encontrarse a concentraciones medias de $0,1 \text{ mgKg}^{-1}$, si bien estas concentraciones en algún tipo de rocas sedimentarias pueden ser considerablemente superiores. Aunque puede encontrarse en el medioambiente de forma natural, debido a sus características como buen conductor de electricidad, bajo punto de fusión o ser altamente resistente a la corrosión, ha sido utilizado en una amplia variedad de industrias lo que ha favorecido su presencia de forma antropogénica, en diferentes ambientes.

Existen diferentes estudios que describen los efectos del Cd^{2+} sobre productores primarios a diferentes niveles. Estos incluyen: inhibición enzimática través de su unión a grupos funcionales o desplazamiento de metales esenciales (Alam y col., 2015), o afectando a la morfología de las células expuestas a este metal, como en el caso de *Chlamydomonas acidophila* que presentó aumento del tamaño de las células y un incremento en número y tamaño de vacuolas y de los gránulos de almidón (Nishikawa y col., 2003), reducción del crecimiento celular (Okamoto y Colepicolo, 1998) o reducción de la fijación de carbono fotosintético (Filippis y Pallaghy, 1994).

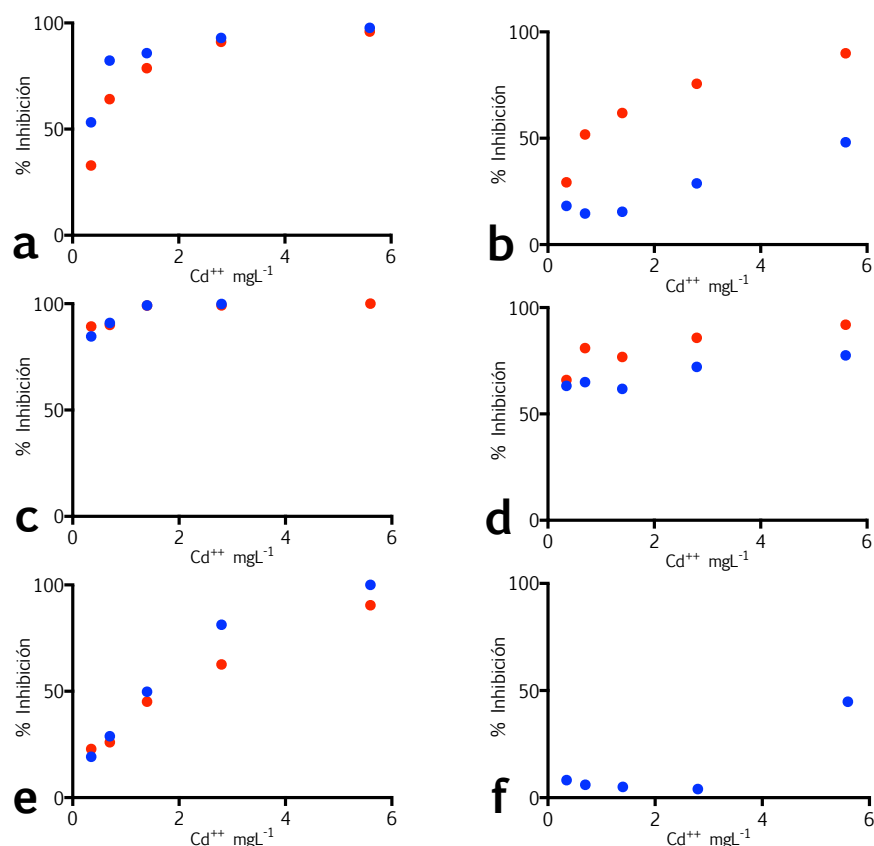
4.2.2.1.1.1 Crecimiento

En la figura 37a-f, se representan los porcentajes de inhibición de los cultivos tras 15 días de exposición al metal frente a las diferentes concentraciones de Cd^{2+} (curvas de crecimiento en el Anexo II, Figs.1 y 2).

Los cultivos de *Parachlorella* sp., *T. obliquus* y *Coelastrella* sp. mostraron porcentajes de inhibición mayores que *S. bacillaris*, *Porphyridium* sp. y *Trebouxiophyceae* sp., incluso a concentraciones menores. Se observa que el cadmio a las mismas concentraciones tiene un efecto dependiente del pH en el cultivo *Trebouxiophyceae* sp., presentando una mayor inhibición al menor pH y que el cultivo *Porphyridium*, es el que muestra mayor tolerancia al este metal, no llegando la concentración más alta probada ($5,6 \text{ mgL}^{-1}$) a inhibir el 50% del crecimiento del microorganismo.

El análisis ANOVA muestra que los cultivos expuestos a todas las concentraciones de cadmio probadas, tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,0001$) con la excepción del cultivo de *Porphyridium* sp. ($p > 0,05$), en el que no se observan diferencias significativas en concentraciones inferiores a $2,8 \text{ mgL}^{-1}$ (Anexo II, Figs.1 y 2).

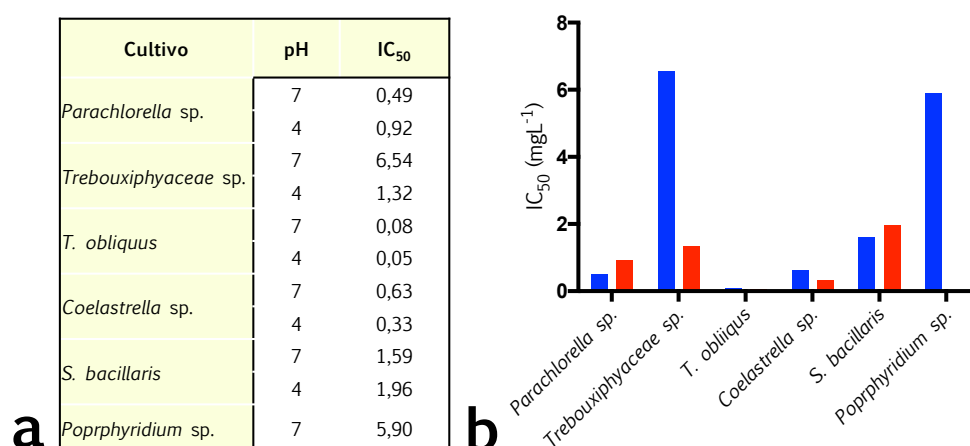
Figura 37. Inhibición del crecimiento de las microalgas, expresada como porcentaje, tras 15 días de exposición frente a distintas concentraciones de Cd^{2+} a pH4 (rojo) y pH7 (azul): a) *Parachlorella* sp., b) *Trebouxiophyceae* sp., c) *T. obliquus*, d) *Coelastrella* sp., e) *S. bacillaris* y f) *Porphyridium* sp.



En la figura 38 se resumen los valores de IC_{50} obtenidos. El cultivo de *Trebouxiophyceae* sp. cultivado a pH7 presentó un valor de IC_{50} de $6,5 \text{ mgL}^{-1}$ que se

corresponde con el porcentaje de inhibición más reducido de los calculados, siendo este cultivo el que mejor tolera las concentraciones de cadmio a las que fue expuesto, junto con el cultivo de *Porphyridium* sp. con un valor de IC_{50} similar de 6 mgL^{-1} . En el cultivo de *S. bacillaris* no existe casi diferencia entre los dos pHs, encontrándose los valores entre 1,9 y $1,6 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente. *T. obliquus* es el cultivo que resulta ser el más sensible a las concentraciones probadas, teniendo los valores de IC_{50} unas diez veces inferiores ($0,05$ a pH4 y $0,08$ a pH7) a la mayoría de las otras muestras, que se colocan en un rango de $0,5$ a 2 mgL^{-1} .

Figura 38. a) Tabla y b) histograma correspondiente de los IC_{50} calculados de las microalgas aisladas frente a diferentes concentraciones de Cd^{2+} a pH 7 (azul) y a pH4 (rojo).



4.2.2.1.2 Microscopía óptica

En las figuras 39a y b se observan las células de *Parachlorella* sp. a pH7 y pH4 respectivamente, a la concentración de Cd^{2+} correspondiente a $2,8 \text{ mgL}^{-1}$. A diferencia del cultivo control (Fig. 19a y b), en ambos casos, las células se encontraron englobadas en un mucílago extracelular. A pH7 se observan unas estructuras más o menos esféricas adsorbidas a la superficie celular de algunas microalgas tanto en las que están vivas como en los restos de las envolturas celulares. Por el contrario, a pH4 (Fig. 39b) no se observó este fenómeno. La morfología celular presentó algunas modificaciones tanto en el tamaño como en la morfología correspondiente a la pérdida de la esfericidad, reducción del tamaño y pérdida de coloración a ambos pHs que podría deberse a algún daño en el aparato fotosintético. Como se muestra en la figura 39c, a pH7 y concentración $5,6 \text{ mgL}^{-1}$, *Trebouxiphyaceae* sp. no experimentó ninguna alteración ni modificación celular comparándola con el control (Fig. 22a) mientras que a pH4 (Fig. 39d) a la misma concentración de metal, se observó una reducción del tamaño celular, desplazándose la media del diámetro desde $10\text{-}13 \text{ }\mu\text{m}$ del control a $3\text{-}7 \text{ }\mu\text{m}$ en las células tratadas (Anexo II, Fig. 9d). *T. obliquus*. exhibió a pH7 a una concentración de $0,7 \text{ mgL}^{-1}$ (Fig. 39e) un cambio morfológico muy pronunciado, pasando de una población con un número elevado de células, ovaladas, en cenobios tetracelulares y con las características terminaciones en puntas, al ser éstas casi totalmente esféricas y con la

formación de un mucílago extracelular que no se visualizó en el control (Fig. 25a). En la figura 39f se muestra la micrografía del mismo cultivo expuesto a pH4 a $2,8 \text{ mgL}^{-1}$ de Cd^{2+} , observándose algunos cambios morfológicos como la desaparición de las terminaciones en punta y la forma esférica de las células. En la micrografía del cultivo de *Coelastrella* sp. a pH 4 expuesto a una concentración de $5,6 \text{ mgL}^{-1}$ de Cd^{2+} (Fig. 40b), se observa una reducción del tamaño celular medio de 10 a $8 \mu\text{m}$ (Anexo II, Fig. 9h) con respecto al control (Fig. 28b). A pH7, a la misma concentración, no se observaron las variaciones morfométricas encontradas a pH4 y se distingue adsorción del metal alrededor de algunas células (Fig. 40a). *S. bacillaris* cultivado a pH7 a la concentración de $2,8 \text{ mgL}^{-1}$, exhibe una agregación celular (Fig. 40c) y la presencia de un mucílago extracelular que no se observó en el crecimiento de esta microalga en el cultivo sin metal (Fig. 31a). El mismo cultivo a pH4 expuesto a una concentración de $5,6 \text{ mgL}^{-1}$ no presentó diferencias morfológicas con respecto al control (Fig. 31b). Las células de *Porphyridium* sp. a pH7 a la concentración de $5,6 \text{ mgL}^{-1}$ presentaron alteraciones de los contornos celulares (Fig. 40e y f) con respecto a las células del cultivo control (Fig. 34) mientras no se observaron variaciones en el tamaño ni adsorción celular.

Figura 39. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Cd^{2+}]$: a) *Parachlorella* sp. pH7; b) *Parachlorella* sp. pH4; c) *Trebouxiophyceae* sp. pH7; d) *Trebouxiophyceae* sp. pH4; e) *T. obliquus* pH7; f) *T. obliquus* pH4. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfológica.

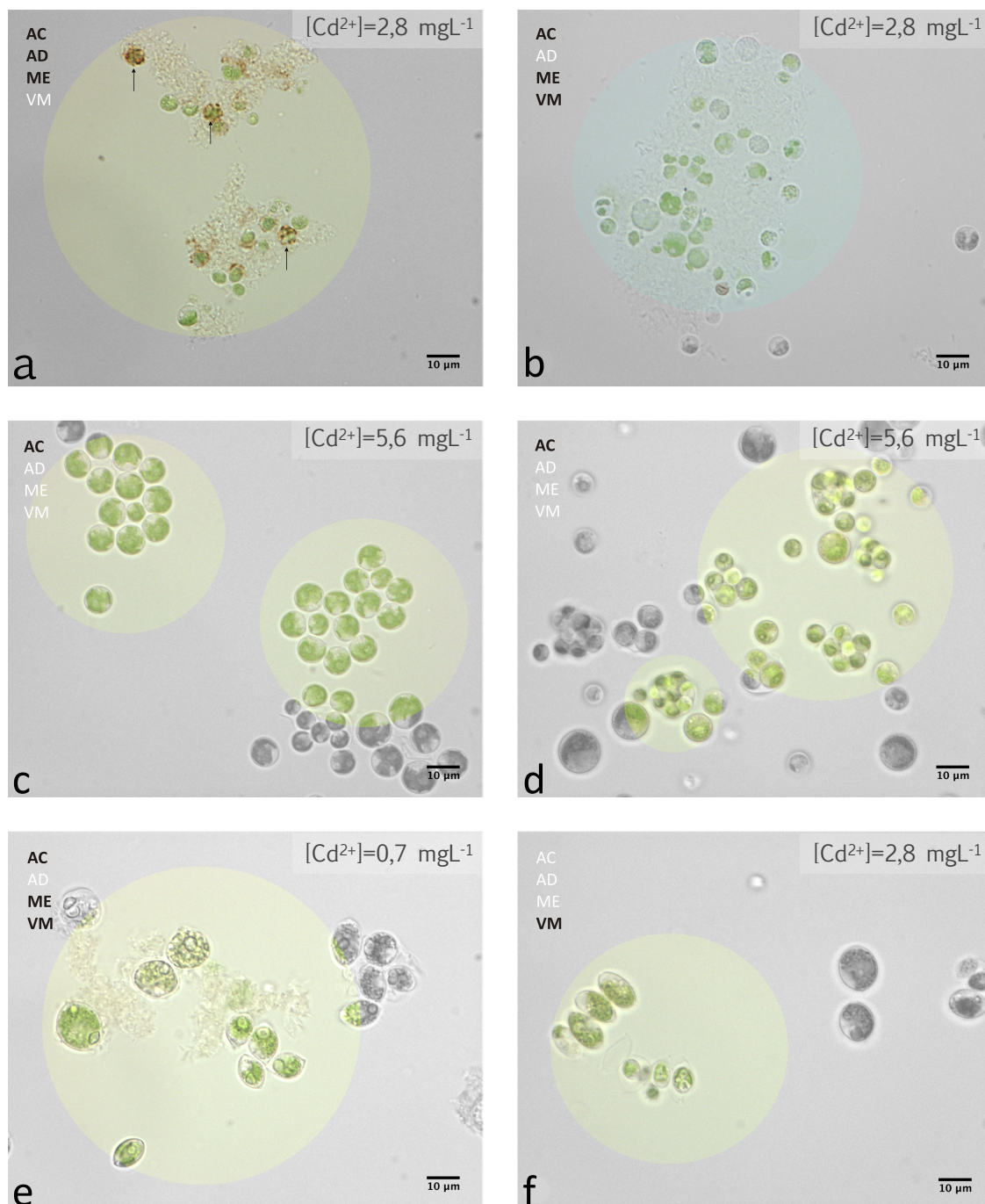
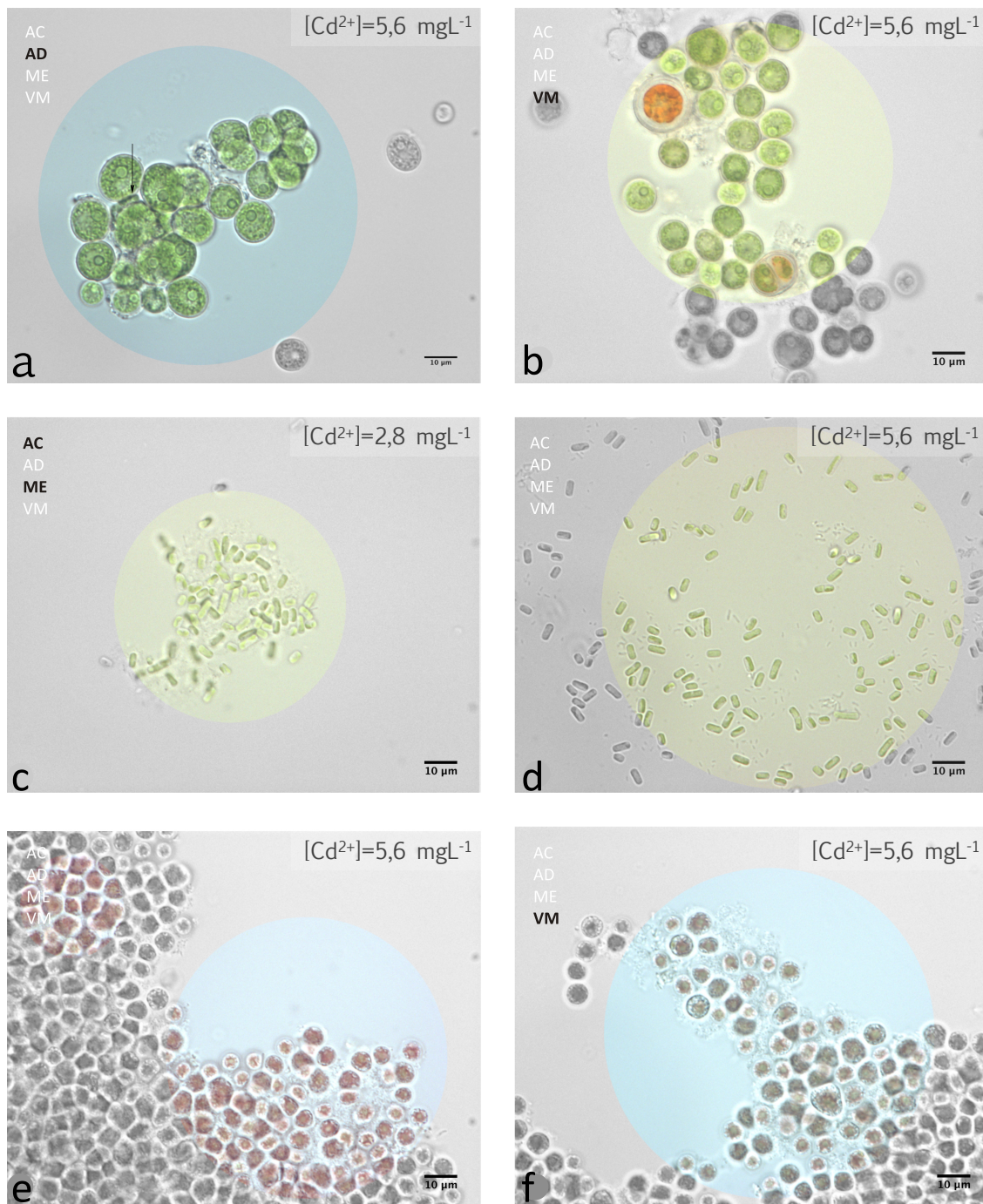


Figura 40. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Cd^{2+}]$: a) *Coelastrella* sp. pH7; b) *Coelastrella* sp. pH4; c) *S. bacillaris* pH7; d) *S. bacillaris* pH4; e y f) *Porphyridium* sp. pH7. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.



Como conclusiones a los resultados obtenidos con este metal podemos decir que los aislados de microalgas con mayor tolerancia a las concentraciones de Cd^{2+} probadas, fueron *Trebouxiophyceae* sp. y *Porphyridium* sp., ambos a pH7, cuyos porcentajes de crecimiento con respecto al control resultaron ser del 70% para ambas especies, con unos IC_{50} de 6 y 8 mgL^{-1} respectivamente. *Trebouxiophyceae* sp. a pH4, por el contrario, presenta un valor de IC_{50} mucho más bajo, comparable con el resto de las microalgas estudiadas, posiblemente por la diversa biodisponibilidad del metal dependiente de pH. Se pueden ordenar los aislados, según la exposición al cadmio del más al menos tolerante: *Trebouxiophyceae* sp pH7> *Porphyridium* sp.> *S. Bacillaris* pH4> *S. Bacillaris* pH7> *Trebouxiophyceae* sp. pH4> *Parachlorella* sp pH4> *Parachlorella* sp. pH7> *T. Obliquus* pH7> *Coelastrella* sp. pH 4> *T. Obliquus* pH4> *Coelastrella* sp. pH7. Comparando los resultados obtenidos con otros estudios existentes en la literatura, se observa que la mayoría de los IC_{50} son consistentes con los resultados obtenidos, como por ejemplo comparándolos con el trabajo de Gissi y col. que sobre la microalga *Phaeocystis antarctica* calcularon un IC_{50} de 1,5 mgL^{-1} (Gissi y col., 2015) o en el caso de *Scenedesmus armatus* cuyos valores obtenidos varían entre 15 mgL^{-1} y 0,5 mgL^{-1} (Tukaj y col., 2007) o como el índice de 0,485 mgL^{-1} calculado para *Chlorella sorokiniana* en el trabajo de Liang (Liang y col., 2017). En la microalga *Chlamydomonas* sp., aislada del río Tinto, los ensayos de tolerancia a este metal dieron un valor más alto, correspondiente a 22 mgL^{-1} (Aguilera y Amils, 2005). Para *S. obliquus* se ha reportado un IC_{50} de 1,9 mgL^{-1} (Monteiro y Cunningham, 2012) para *Chlorella vulgaris* un IC_{50} de 3-7 mgL^{-1} (Cheng y col., 2016) y para *S. bacillaris* un IC_{50} de 5 mgL^{-1} (Skowroński y col., 1991).

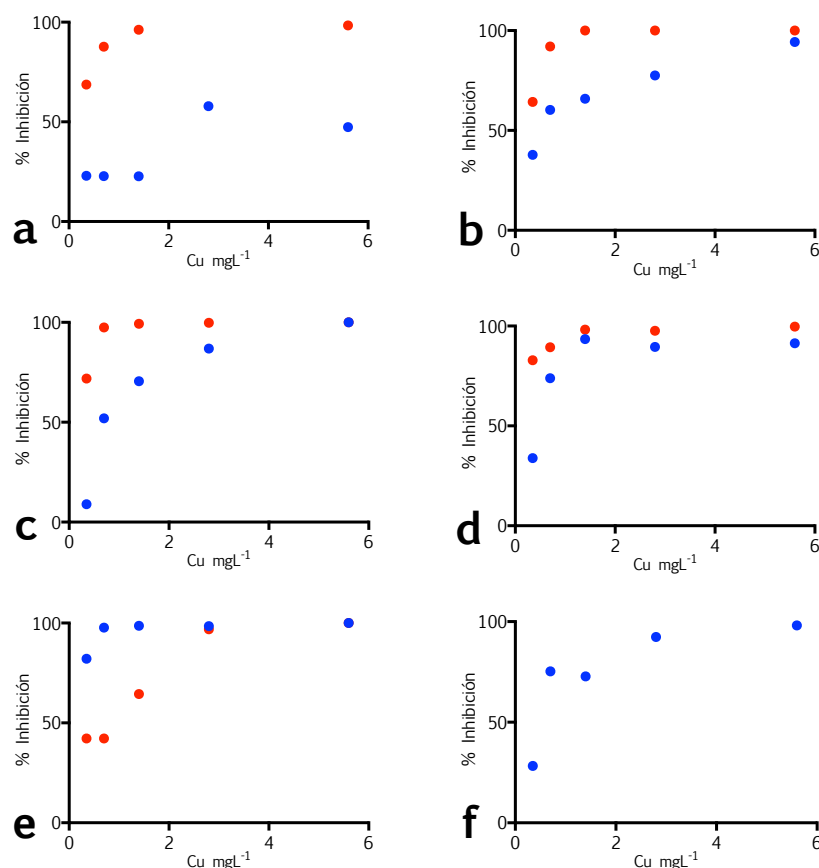
4.2.2.1.2 Ensayo de tolerancia frente a cobre

El cobre es uno de los metales más importantes en el sector minero ya que debido a sus características físico-químicas es el segundo mejor conductor eléctrico detrás de la plata. Además, los compuestos de cobre son utilizados en diferentes industrias y en agricultura principalmente como fungicidas, alguicidas e insecticidas. Es, al igual que el cadmio y el hierro, un oligoelemento esencial para todos los organismos vivos (Price y Morel, 1994; Bossuyt y Janssen, 2004). En los organismos fotosintéticos, este metal participa en la cadena de transporte de electrones y también desempeña un papel como cofactor de varias enzimas oxidantes. La toxicidad del cobre sobre las microalgas es un fenómeno descrito por numerosos autores. Así se ha observado que este metal actúa a nivel de la membrana celular disminuyendo su permeabilidad y sobre la división celular. Dentro de la célula, el cobre puede ser responsable de la inactivación de enzimas esenciales desplazando el metal activo o creando enlaces con los grupos sulfidrilos, aminos y carboxilos (Johnson y col., 2007). También se ha descrito la inhibición de la transferencia de electrones en los cloroplastos (Shioi y col., 1978), la formación de radicales reactivos, la destrucción de la membrana del cloroplasto (Sandmann y Böger, 1980), la inhibición de la formación de pigmentos fotosintéticos y la disminución de las concentraciones intracelulares de K^+ y Na^+ (De Filippis y Ziegler, 1993).

4.2.2.1.2.1 Crecimiento

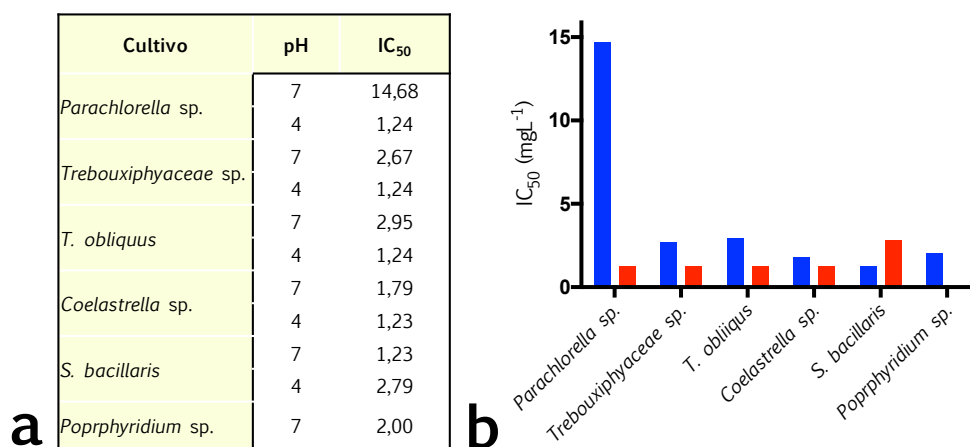
Los datos procedentes de los experimentos llevados a cabo exponiendo los cultivos a concentraciones de Cu^{2+} en un rango de $1,25 \text{ mgL}^{-1}$ hasta 20 mgL^{-1} se resumen en las figuras 41 y 42 y en las figuras 3 y 4 del anexo II. Los porcentajes de inhibición de las microalgas cultivadas en presencia de cobre muestran un efecto dependiente del pH en la tolerancia a este metal. En los cultivos de *Parachlorella* sp., *Trebouxioephyaceae* sp. y *T. obliquus*, se observa que a pH4, este metal ejerce un efecto más tóxico mientras para el cultivo de *S. bacillaris* el efecto observado es el contrario. El resultado del análisis ANOVA ($p < 0,0001$) indica que las muestras cultivadas en presencia de todas las concentraciones de cobre probadas, tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (Anexo II, Figs. 3 y 4).

Figura 41. Inhibición del crecimiento de las microalgas, expresada como porcentaje, tras 15 días de exposición frente a distintas concentraciones de Cu^{2+} a pH4 (rojo) y pH7 (azul): a) *Parachlorella* sp., b) *Trebouxioephyaceae* sp., c) *T. obliquus*, d) *Coelastrella* sp., e) *S. bacillaris* y f) *Porphyridium* sp.



Los IC_{50} obtenidos (Fig. 41a y b) muestran que el aislado *Parachlorella* sp. cultivado a pH7 es el que mayor tolerancia muestra frente a este metal, con un valor de casi 15 mgL^{-1} de cobre; el resto de los aislados estudiados se mueven en un rango muy reducido, entre $1,2$ y 3 mgL^{-1} mostrando un comportamiento muy homogéneo.

Figura 42. a) Tabla e b) histograma correspondiente de los IC_{50} calculados de las microalgas aisladas frente a diferentes concentraciones de Cu^{2+} a pH 7 (azul) y a pH4 (rojo).



4.2.2.1.2.2 Microscopía óptica

Utilizando microscopía óptica se pudieron observar los siguientes efectos dependientes de la concentración de Cu^{2+} . En la figura 43 se observan células de un cultivo de *Parachlorella* sp., a pH7 y a una concentración de 10 mgL⁻¹ de Cu (Fig. 43a) y a pH4 a 1,25 mgL⁻¹ (Fig. 43b). Este metal parece tener un efecto muy similar en ambas condiciones observándose las células incluidas en un mucílago extracelular y una visible reducción en su tamaño. A pH7 el diámetro de más del 50% de las células del control (Fig. 19a y b) se encuentra entre 4-5 μ m, mientras que en presencia del metal se reduce a 3-4 μ m (Anexo II, Fig. 10a). En las figuras 43c y d se observan en las células de *Trebouxiphyceae* sp. unas variaciones morfológicas con respecto al control: una mayor agregación celular y un aumento del tamaño (Anexo II, Figs. 10c y d). En el cultivo de *Tetrademus obliquus* a ambos pHs se observó una acentuada disminución en la longitud de las células pasando de 4-6 μ m en el control a 3-4 μ m tras la exposición al metal (Anexo II, Figs. 10e y f). Se observó un cambio en la morfología a las concentraciones de 1,25 mgL⁻¹ a pH7 (Fig. 43e) y 5 mgL⁻¹ a pH4 (Fig. 43f): la mayoría de las células aparecen más estrechas y con las puntas aún más agudas que en el control (Figs. 25a y b). Además, como en la mayoría de los casos observados, las células se encuentran incluidas en un mucílago extracelular. Las células de *Coelastrella* sp. cultivadas en presencia de una concentración de 2,5 mgL⁻¹ de Cu^{2+} , a ambos pHs, presentaron una reducción del tamaño (Anexo II, Figs. 10g y 10h) de 7-12 μ m a 4-8 μ m (Fig. 44a). *S. bacillaris* mostró un color más claro y células individuales a pH7 y 20 mgL⁻¹ de Cu^{2+} (Fig. 44c), que a pH4 y una concentración de 5 mgL⁻¹ (Fig. 44d). *Porphyridium* sp., mostró agregación de células a 1,25 mgL⁻¹ de metal que no se observó en el cultivo control (Fig. 44e y f). En los histogramas de la figura 10 del anexo II se resumen las variaciones de tamaño observadas en las muestras expuestas a Cu^{2+} . de todas las microalgas menos las de *S. bacillaris* que no experimentó ningún cambio en relación al control. Cabe destacar que, con la excepción de *Trebouxiphyceae* sp., en el resto de los cultivos expuestos a los dos pHs, se observa la producción de un mucílago extracelular.

Figura 43. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Cu^{2+}]$: a) *Parachlorella* sp. pH7; b) *Parachlorella* sp. pH4; c) *Trebouxiophyceae* sp. pH7 d) *Trebouxiophyceae* sp. pH4; e) *T. obliquus* pH7; f) *T. obliquus* pH4. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.

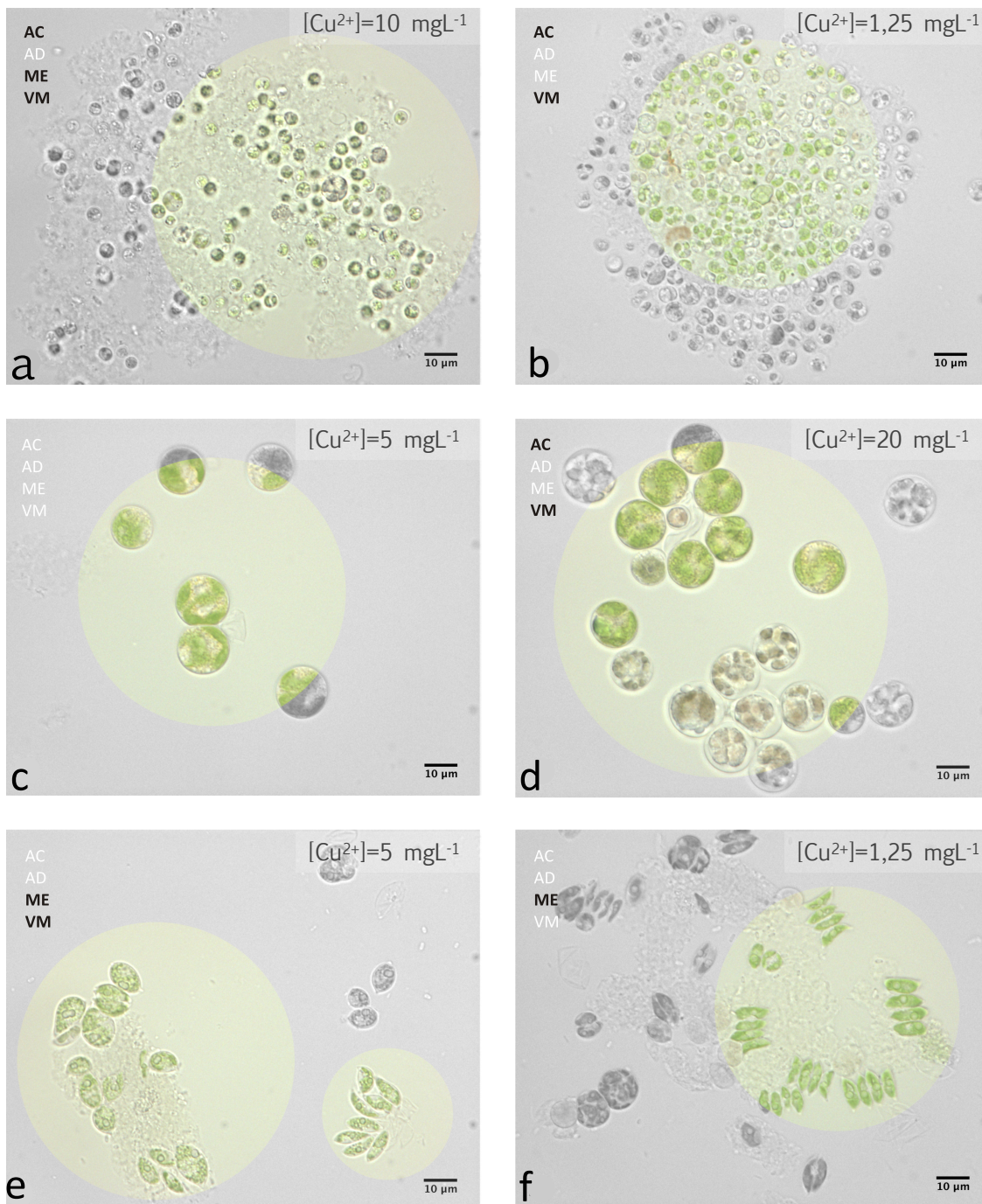
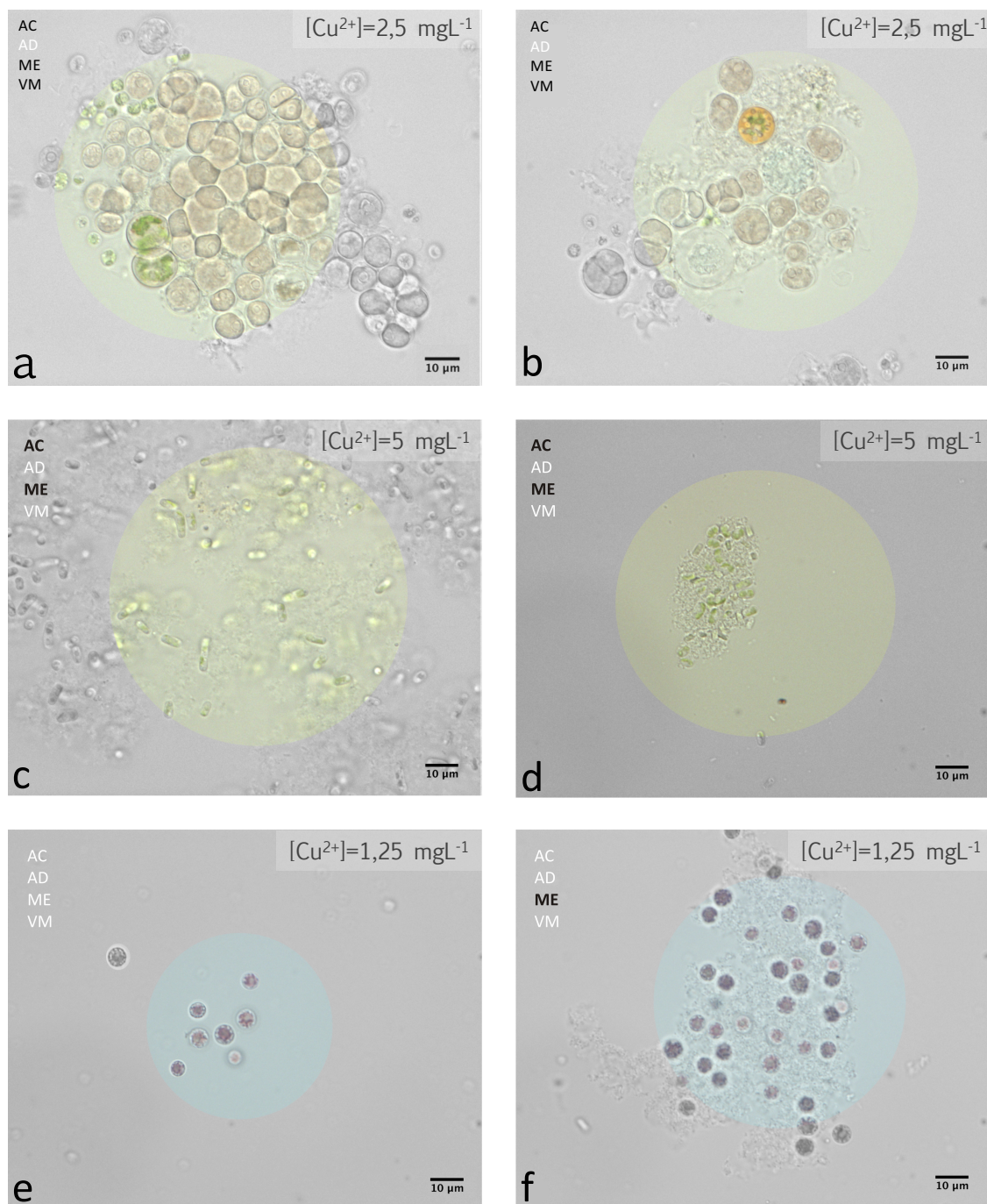


Figura 44. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Cu^{2+}]$: a) *Coelastrella* sp. pH7; b) *Coelastrella* sp. pH4; c) *S. bacillaris* pH7; d) *S. bacillaris* pH4; e) y f) *Porphyridium* sp. pH7. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.



De los resultados obtenidos se puede concluir que todos los aislados expuestos al rango de concentraciones estudiadas muestran una alta sensibilidad a este metal, siendo el máximo valor de IC_{50} de 15 mgL^{-1} , correspondiente al único aislado *Parachlorella* sp. a pH7, mientras en el resto de los casos, los valores se encuentran por debajo de los 3 mgL^{-1} . La alta toxicidad observada en los cultivos de otras especies de microalgas expuestos a cobre, ha sido descrita por otros autores. Por ejemplo, Franklin y col., obtuvieron valores de IC_{50} de 10 mgL^{-1} para las algas de agua dulce *Chlorella* sp. y *Selenastrum capricornutum* (Franklin y col., 2000). En un trabajo llevado a cabo por Anderson y Morel sobre los efectos del cobre en el dinoflagelado *Gonyaulax tamariensis*, se concluyó que la concentración de 1 mgL^{-1} de metal era suficiente para interferir con algunos de sus procesos celulares (Anderson y Morel, 1978). Este dato se acerca más al rango de valores obtenido en este trabajo (excluyendo el cultivo de *Parachlorella* sp. a pH7) todos menores de 3 mgL^{-1} . Estos valores son consistentes con el estudio realizado por (Kagalou y col., 2002) sobre *Isochrysis galbana*, en el que concentraciones de Cu^{2+} de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ tuvieron efectos significativos sobre su tasa de crecimiento, y con el realizado sobre *Phaeocystis antarctica* (Gissi y col., 2015), que presentó un IC_{50} de $0,059 \text{ mgL}^{-1}$. Existen muchos datos en la literatura sobre la resistencia a cobre de las microalgas, sin embargo, los valores que se describen por diferentes grupos para una misma especie son en ocasiones muy dispares. Un ejemplo es el expuesto por Debelius y col., (2009) que obtiene, comparados con los índices encontrados en este estudio, valores mucho más bajos: *Tetraselmis chuii* ($IC_{50}=0,330 \text{ mgL}^{-1}$), *Rhodomonas salina* ($IC_{50}=0,048 \text{ mgL}^{-1}$), *Chaetoceros* sp. ($IC_{50}=0,088 \text{ mgL}^{-1}$), *Isochrysis galbana* ($IC_{50}=0,058 \text{ mgL}^{-1}$), *Nannochloropsis gaditana* ($IC_{50}=0,137 \text{ mgL}^{-1}$) (Debelius y col., 2009). En otro trabajo se obtiene un IC_{50} en el cultivo de *Chlorella sorokiniana* expuesta a Cu un valor de $0,249 \text{ mgL}^{-1}$ (Liang y col., 2017). Una posible explicación para esta diferencia, que puede abarcar distintos órdenes de magnitud en los resultados, la proponen Janssen y Heijrick, que la atribuyen, al menos parcialmente, a las diferencias en la composición de los medios de cultivo utilizados, a la aportación de nutrientes, la temperatura, el pH, la dureza y agentes quelantes en el agua afectan tanto al rendimiento de las algas como a la biodisponibilidad del metal, y pueden dar resultados muy distintos (Knauer y col., 1998; Janssen y Heijrick, 2003; Bossuyt y Janssen, 2004).

4.2.2.1.3 Ensayo de tolerancia frente a hierro

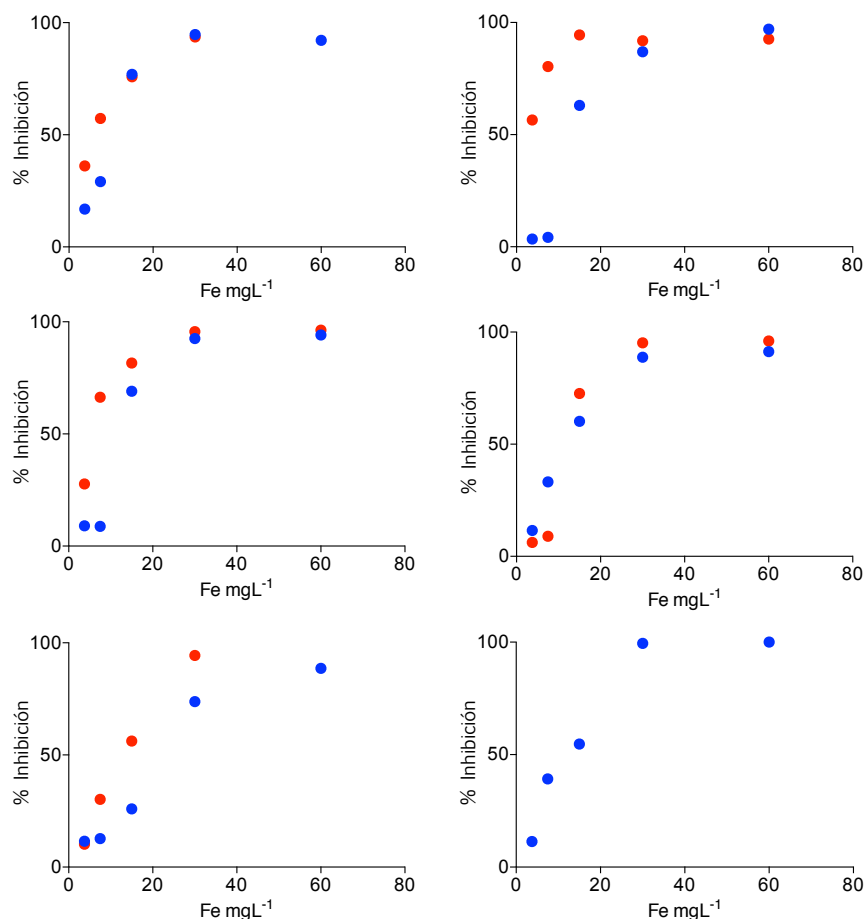
El hierro es un elemento indispensable para todos los seres vivos (eucariotas y procariotas) que han evolucionado adaptándose a su baja biodisponibilidad a través de diferentes estrategias (La Fontaine y col., 2002). En microalgas, juega un papel esencial en la fotosíntesis (estando involucrado en los centros de reacción del transporte de electrones) en la respiración, en la regulación de la síntesis de caroteno, en la fijación de nitrógeno y en la síntesis de DNA, siendo un cofactor de diversas enzimas involucradas en estos procesos metabólicos (Pascal y Dome, 1994; Choi y col., 2002; Paz y col., 2007; Menzyanova y col., 2009; Subramaniyam y col., 2016). En los últimos años, debido a la acción antrópica, se ha registrado un incremento de los niveles de hierro en el suelo y en las aguas residuales. Las actividades que más liberan

en el medio ambiente este metal son la industria del cobre, del hierro y acero (Subramaniyam y col., 2016). Existen pocos estudios sobre los efectos tóxicos de este metal sobre las microalgas, siendo, hoy en día, un elemento poco biodisponible y no tan tóxico como los metales pesados, sobre los que se ha centrado más la atención en las últimas décadas. Se ha descrito su implicación en la formación de radicales de oxígeno (Paz y col., 2007) y en la apoptosis (Bowler, 2012). Se ha incluido en este estudio por su papel fundamental en el lugar de muestreo objeto de este trabajo, ya que el río Tinto posee una elevada concentración de este metal.

4.2.2.1.3.1 Crecimiento

Los datos procedentes de los experimentos llevados a cabo exponiendo los cultivos de distintos aislados a concentraciones de Fe^{2+} en un rango de $3,25 \text{ mgL}^{-1}$ hasta 60 mgL^{-1} se resumen en las figuras 45, 46 y en las figuras 5 y 6 del anexo II. La figura 45 muestra un efecto dependiente de la concentración e independiente del pH en la mayoría de los casos. En todas las muestras se llega al 100% de la inhibición de la población a las dos concentraciones más altas probadas e inhibiciones cercanas al cero en las más bajas.

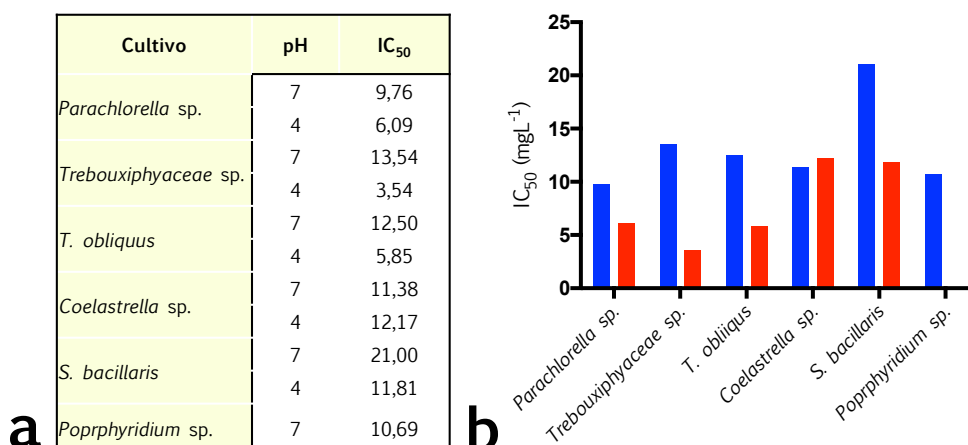
Figura 45. Inhibición del crecimiento de las microalgas, expresada como porcentaje, tras 15 días de exposición frente a distintas concentraciones de Fe^{2+} a pH4 (rojo) y pH7 (azul): a) *Parachlorella* sp., b) *Trebouxiophyceae* sp., c) *T. obliquus*, d) *Coelastrella* sp., e) *S. bacillaris* y f) *Porphyridium* sp.



El análisis ANOVA muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en la mayoría de las muestras y concentraciones ensayadas (valores p entre $\leq 0,05$ y $\leq 0,0001$). No se observan diferencias significativas con el control en los cultivos: *Trebouxiphyaceae* sp. a pH7, *Coelastrella* sp. a pH4 y *T. obliquus* a pH7 en concentraciones inferiores de $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ (Anexo II, Fig. 5d, 5e y 5h); los de *S. bacillaris* a pH7 en concentraciones inferiores a $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ (Anexo II, Fig. 6b) y en *Porphyridium* sp. a la concentración de $3,75 \text{ mgL}^{-1}$ (Anexo II, Fig. 6c). A pesar de que las curvas de inhibición no lo reflejen, en la tabla y el histograma que muestran los datos obtenidos por el cálculo del índice IC_{50} (Fig. 46a y b) se puede observar que los cultivos de *Trebouxiphyaceae* sp., *T. obliquus* y *S. bacillaris* sufren un efecto mayor a pH4 que a pH7, con unos valores de 4 mgL^{-1} , 6 mgL^{-1} y 12 mgL^{-1} a pH4 y 14 mgL^{-1} , 13 mgL^{-1} y 21 mgL^{-1} a pH7 respectivamente. Los aislados de *Parachlorella* sp. y *Coelastrella* sp. mostraron resultados similares de inhibición del crecimiento frente a Fe^{2+} tanto a pH4 como a pH7, y, por tanto, reflejándose este comportamiento en los valores de IC_{50} a ambos pHs.

Los valores más altos de IC_{50} obtenidos fueron para *Trebouxiphyaceae* sp. y *S. bacillaris* a pH7, siendo de 14 mgL^{-1} y 21 mgL^{-1} , respectivamente. Por otro lado, el valor más bajo del IC_{50} se observó para *Trebouxiphyaceae* sp. pH4, demostrando así la importancia del pH del medio para este aislado con respecto a la presencia del hierro.

Figura 46. a) Tabla e b) histograma correspondiente de los IC_{50} calculados de las microalgas aisladas frente a diferentes concentraciones de Fe^{2+} a pH 7 (azul) y a pH4 (rojo).



4.2.2.1.3.2 Microscopía óptica

Los cultivos de todas las microalgas en presencia de Fe^{2+} visualizados al microscopio óptico, mostraron la presencia de unos agregados de color naranja-marrón debidos a la precipitación del hierro. En el caso de *Parachlorella* sp. a pH7, de *T. obliquus* a pH7, *Coelastrella* sp. a pH4 y *Porphyridium* sp. a pH7 se observaron unas estructuras esféricas

o acumulación del metal (indicadas por las flechas) adheridas a la superficie de las células o a las carcasas (Figs. 47a y e, 48b y e). En el caso de *T. obliquus* se observó una variación en la forma de las células que aparecen redondeadas a pH4 (Fig. 47f). Se han observado distintas variaciones morfométricas relacionadas con una diferencia del tamaño entre los cultivos expuestos a tratamiento en presencia de hierro a 60 mgL⁻¹ comparadas con los controles (Figs. 25a y b). Las células de todos los cultivos aparecen más pequeñas, con la excepción de los cultivos *Trebouxiophyceae* sp. y de *S. bacillaris* (Anexo II Fig. 11 a-i). En todos los cultivos se observa la producción de un mucílago extracelular similar al visualizado en los cultivos expuestos a otros metales.

Figura 47. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[\text{Fe}^{2+}]$: a) *Parachlorella* sp. pH7; b) *Parachlorella* sp. pH4; c) *Trebouxiophyceae* sp. pH7; d) *Trebouxiophyceae* sp. pH4; e) *T. obliquus* pH7; f) *T. obliquus* pH4. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.

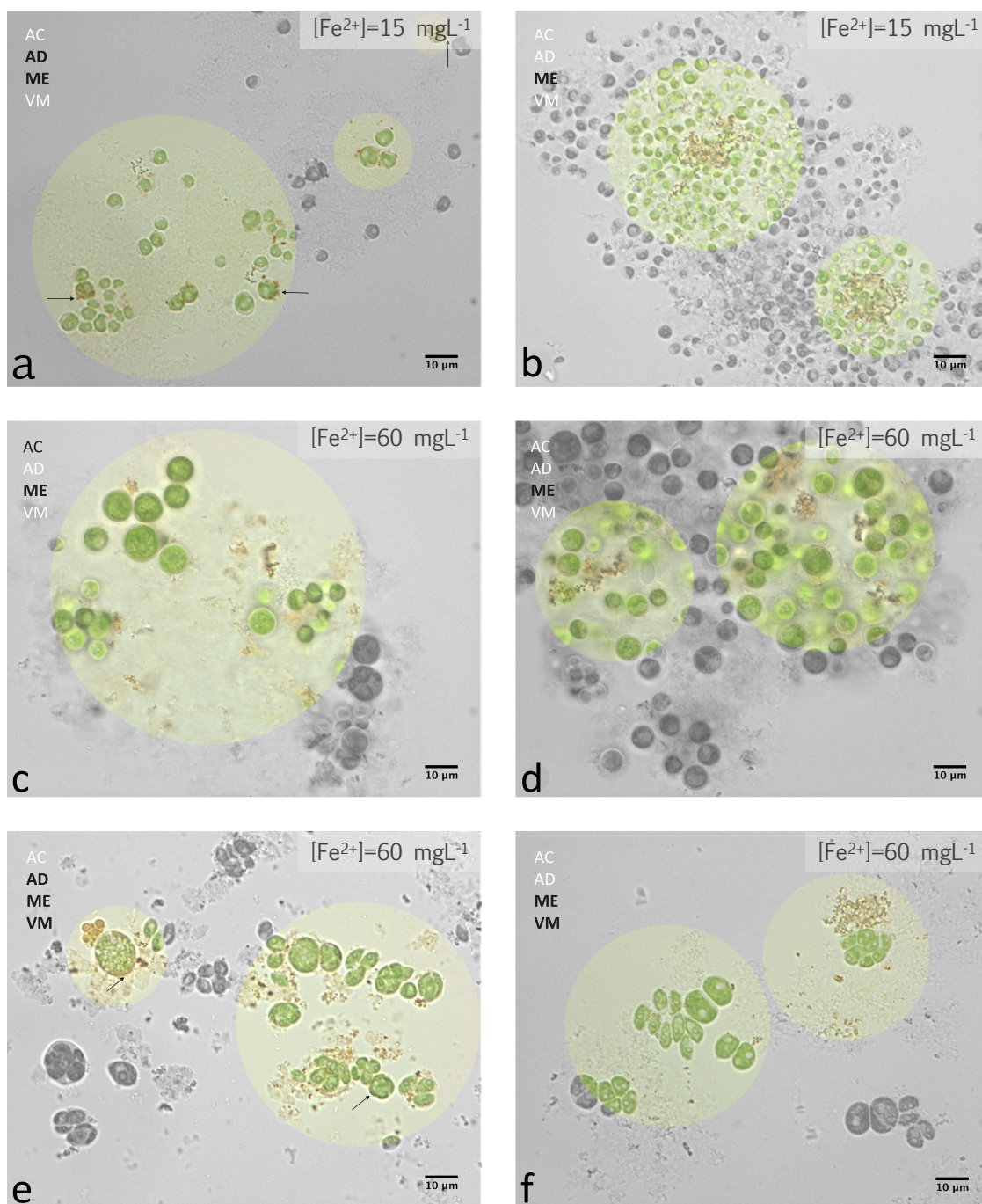
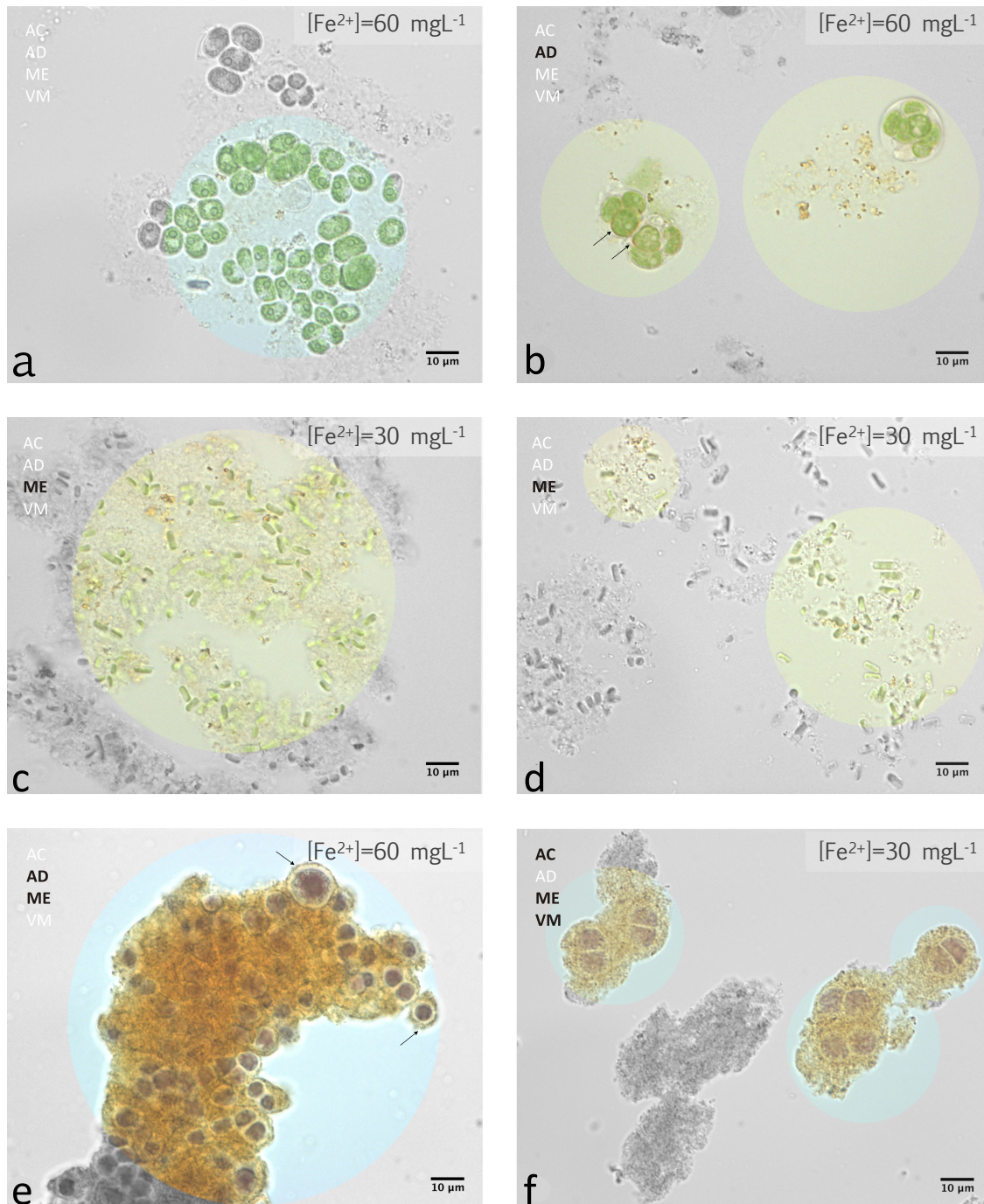


Figura 48. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[\text{Fe}^{2+}]$: a) *Coelastrella* sp. pH7; b) *Coelastrella* sp. pH4; c) *S. bacillaris* pH7; d) *S. bacillaris* pH4; e) y f) *Porphyridium* sp. pH7. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfológica.



Los resultados obtenidos muestran una variación en los IC_{50} correspondientes a los aislados *Trebouxiophyceae* sp., *T. obliquus*, *S. bacillaris* siendo superiores a pH 7 que a pH4 por lo que en estos casos el pH más bajo podría facilitar la toxicidad del metal. Sin embargo, en los casos de *Parachlorella* sp o *Coelastrella* sp. no se observan esta correlación siendo la diferencia entre valores de los IC_{50} de los dos pHs muy reducida. Según la tolerancia observada se pueden ordenar los aislados de la siguiente forma: *S. bacillaris* pH7 > *Trebouxiophyceae* sp. pH7> *T. obliquus* pH7> *Coelastrella* sp. pH 4> *S. bacillaris* pH4> *Coelastrella* sp. pH7> *Porphyridium* sp. pH7> *Parachlorella* sp. pH7> *Parachlorella* sp. pH4> *T. obliquus* pH4> *Trebouxiophyceae* sp. pH4. El número de estudios en la literatura, relacionados con la tolerancia de microalgas al hierro es muy escaso. De hecho, la mayoría estudian la utilización del hierro para potenciar el crecimiento de las microalgas. Se ha encontrado un solo trabajo sobre el estudio de tolerancia de microalgas a concentraciones nocivas de este metal, en el que se llevó a cabo una comparación sobre las clorofitas *Chlorella* sp., *Chlamidomonas* sp. y *Chlorococcum* sp. Los valores de EC_{50} ⁸ obtenidos en ese estudio son consistentes con los registrados en nuestro ensayo, siendo de para los tres aislados de 9,45 mgL^{-1} , 9,05 mgL^{-1} y 8,49 mgL^{-1} respectivamente (Subramaniyam y col., 2016). Se observa la producción del mucílago extracelular excretado por exposición al metal en todos los cultivos ensayados, incluido el aislado correspondiente a *Trebouxiophyceae* sp., en el que no se había encontrado en las muestras expuestas a Cd^{2+} y a Cu^{2+} (Fig40c y d 43c y d).

4.2.2.1.4 Ensayo de tolerancia frente a plomo

El plomo es uno de los contaminantes ambientales más comunes y perjudiciales para el medio ambiente (Needleman, 2004), siendo peligroso para la salud y el bienestar de la mayoría de las seres vivos (Cao y col., 2015).

Tras la eliminación o reducción del contenido de plomo en las gasolinas lo que contribuyó a disminuir los niveles de emisión de este metal al medioambiente de manera considerable, en la actualidad los mayores puntos de emisión se encuentran en industrias como las siderometalúrgicas. Los niveles de plomo están regulados a nivel de la Directivas europeas 1999/30/CE transpuesta a la legislación nacional a través del Real Decreto 1073/2002 que establece un valor límite anual para este contaminante de 0.5 $\mu g m^{-3}$.

Teniendo en cuenta que los organismos fotoautótrofos se encuentran en la base de la cadena trófica, el acumulo de plomo en organismos como las microalgas podría afectar a otros niveles de la cadena en los ecosistemas acuáticos (Goretti y col., 2016). A pesar de que existe algún estudio en el que se observa un incremento del crecimiento en microalgas a bajas concentraciones de Pb, altas concentraciones del metal, junto con el cobre, pueden dañar la permeabilidad de la membrana plasmática llevando a una descompensación de electrolitos (Chen y Folt, 2000) y pueden sustituir el ion Mg^{2+} de la clorofila, perjudicando la actividad fotosintética. En otros estudios, el cultivo de

⁸ IC_{50} a las 96h

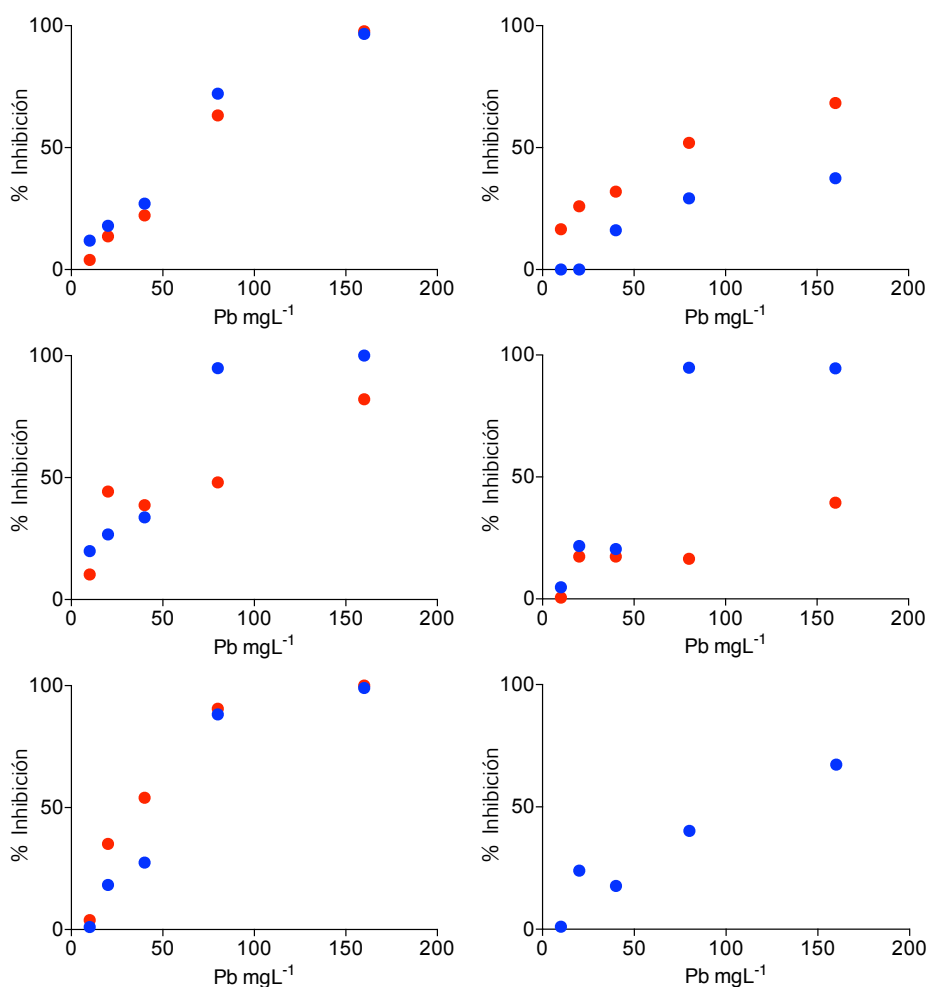
Synechocystis sp. en presencia de Pb y Cd, y de *Spirulina platensis* en presencia de Pb, mostraron una disminución en la concentración de biomasa y pigmentos (clorofila, carotenoide, ficocianina) en los cultivos (Miazek y col., 2015).

La presencia de plomo (Pb) en el cultivo de *Chlorella sorokiniana* dio lugar a la formación de colonias de células de la microalga, junto con un efecto perjudicial sobre el crecimiento y sobre todo sobre el aparato fotosintético (Carfagna y col., 2013).

4.2.2.1.4.1 Crecimiento

Según los datos obtenidos comparando el crecimiento de los aislados expuestos a diferentes concentraciones de Pb con el control (Anexo II, Figs.7 y 8) se observa que los cultivos que tienen mayor tolerancia a este metal son *Trebouxiophyceae* sp. y *Porphyridium* sp. ambos a pH7, y cuyos porcentajes de inhibición con respecto al control se muestran en la figura 49.

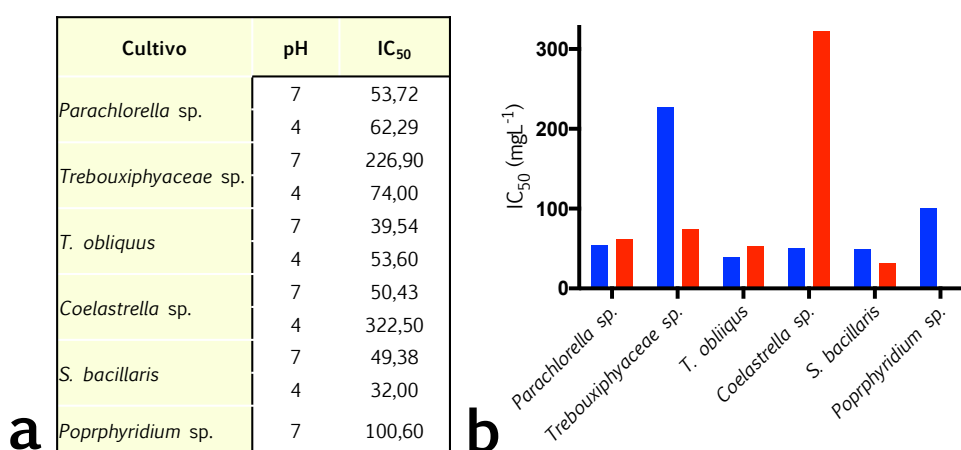
Figura 49. Inhibición del crecimiento de las microalgas, expresada como porcentaje, tras 15 días de exposición frente a distintas concentraciones de Pb^{2+} a pH4 (rojo) y pH7 (azul): a) *Parachlorella* sp., b) *Trebouxiophyceae* sp., c) *T. obliquus*, d) *Coelastrella* sp., e) *S. bacillaris* y f) *Porphyridium* sp.



Se puede observar en los cultivos de *Trebouxiophyceae* sp. y *Coelastrella* sp. la influencia importante que el pH parece tener en el caso de *Trebouxiophyceae* sp. se observó que el cultivo a pH7 es más tolerante que el de pH4, mientras en el caso de *Coelastrella* sp. el microorganismo cultivado a pH7 sufre más la toxicidad de este metal si se compara con el mismo aislado cultivado a pH4.

Los datos obtenidos por el análisis ANOVA (valores p entre $\leq 0,05$ y $\leq 0,0001$) muestran, en la mayoría de los casos, que existen diferencias significativas en el crecimiento entre las muestras cultivadas en presencia del metal frente a los controles. Sin embargo, en los siguientes casos, las muestras expuestas, tienen un comportamiento similar que los controles: *Parachlorella* sp. a pH4 (Anexo II, Fig. 7a) y *Coelastrella* sp. a ambos pHs (Anexo II, Figs. 7e y 7f), *T. obliquus* a pH4 y a pH7 (Anexo II, Figs. 7g y 7h) y *S. bacillaris* sp. a ambos pHs (Anexo II, Figs. 8a y 8b) a concentraciones inferiores a 10 mgL⁻¹; *Trebouxiophyceae* sp. a pH7 con valores inferiores a 20 mgL⁻¹ de plomo en el medio, y *Porphyridium* sp. a pH7 en todas las muestras con valores inferiores de 40 mgL⁻¹ de plomo en el medio de cultivo. Los valores de IC₅₀ (Fig. 50) de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de plomo, muestran en *Trebouxiophyceae* sp. a pH7, en *Coelastrella* sp. cultivado a pH4 y en *Porphyridium* sp. a pH7 unos valores extrapolados sorprendentemente altos, en un rango entre 100 y 320 mgL⁻¹. En las curvas de crecimiento (Anexo II Figs. 7d, 7e y 8c) se observa que, a pesar de que existan diferencias estadísticamente significativas con el control, estas muestras crecen también en las concentraciones más altas de plomo probadas, 160 mgL⁻¹.

Figura 50. a) Tabla y b) histograma correspondiente de los IC₅₀ calculados de las microalgas aisladas frente a diferentes concentraciones de Pb²⁺ a pH 7 (azul) y a pH4 (rojo).



Los valores de IC₅₀ relativos al resto de las microalgas crecidas en presencia de plomo, muestran a pH7 y a pH4 valores de IC₅₀ entre 50 mgL⁻¹ y 60 mgL⁻¹ en *Parachlorella* sp., entre 40 mgL⁻¹ y 50 mgL⁻¹ en *T. obliquus* y entre 30 mgL⁻¹ y 50 mgL⁻¹ en *S. bacillaris*. Los valores obtenidos en *Trebouxiophyceae* sp. a pH4 y en *Coelastrella* sp. a pH7, son consistentes con los obtenidos en los otros cultivos estando entre 50 mgL⁻¹ y 70 mgL⁻¹.

4.2.2.1.4.2 Microscopía óptica

En la figura 51 se visualizan las células de los diferentes cultivos mediante microscopia óptica. En todos los casos las concentraciones de metal analizadas fueron de 160 mgL^{-1} para pH7 y 20 mgL^{-1} para pH4. Tanto para *Parachlorella* sp. a pH7 (Fig. 51a) como para *Trebouxiophyceae* sp. a pH7 y a pH4 (Fig. 51c y d), se observa un denso mucílago extracelular y la consecuente agregación de las microalgas. Las células de *T. obliquus* muestran un comportamiento diferente según se trate de un pH u otro y si se comparan en ambos casos con el control (Fig. 25). Así a pH7 (Fig. 51e) las células tienen una apariencia redondeada mientras a pH4 (Fig. 51f) la forma es similar a la del control, pero más estrechas en su parte longitudinal (Anexo II, Fig. 12e y 12f). En ambos casos se observa la presencia de una matriz extracelular. En *Coelastrella* sp., las diferencias son significativas entre pH7 y pH4. A pH7 (Fig. 52a) se observan las células visiblemente más pequeñas que el control (Anexo II, Figs. 12g y 12h) y con partículas de metal adheridas a la envoltura exterior de las células, así como en las carcasas. Se observan gránulos densos no observables en las células sin tratar y el color verde aparece más tenue. A pH4, (Fig. 52b) se observa una reducción del tamaño (Anexo II, Fig. 12h) de todas las células que se encuentran unidas a la matriz extracelular. A ambos pH los diámetros disminuyen unos $3 \mu\text{m}$ con respecto a las células control. El cultivo de *S. bacillaris* (Figs. 52c pH7 y 52d pH4), no muestra diferencia con respecto al control. En el cultivo de *Porphyridium* sp. a la concentración de 20 mgL^{-1} (Fig. 52e), no se observan cambios sustanciales en la morfología celular si se compara con el control (Fig. 34) debido a que se encuentran englobadas en una matriz extracelular donde también está atrapado el metal. Sin embargo, a concentraciones más bajas de metal, 5 mgL^{-1} (Fig. 52f), las células fueron más pequeñas que las del control (Anexo II, Fig. 12i), con esporádicas células de tamaño más grande y en algunos casos con partículas de metal alrededor de las envolturas externas de las mismas. La matriz extracelular está presente también en este cultivo.

Figura 51. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Pb^{2+}]$: a) *Parachlorella* sp. pH7; b) *Parachlorella* sp. pH4; c) *Trebouxiophyceae* sp. pH7; d) *Trebouxiophyceae* sp. pH4; e) *T. obliquus* pH7; f) *T. obliquus* pH4. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.

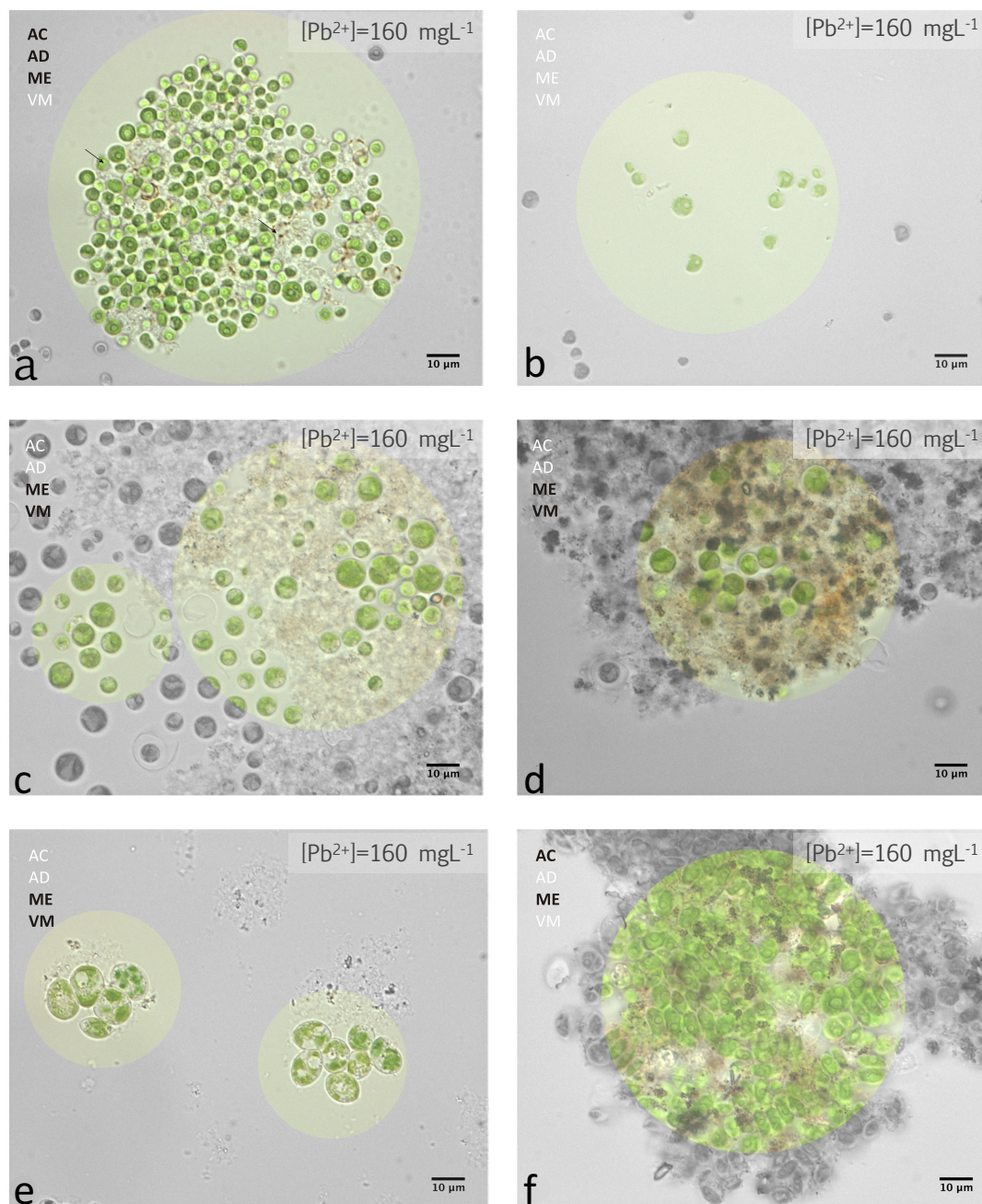
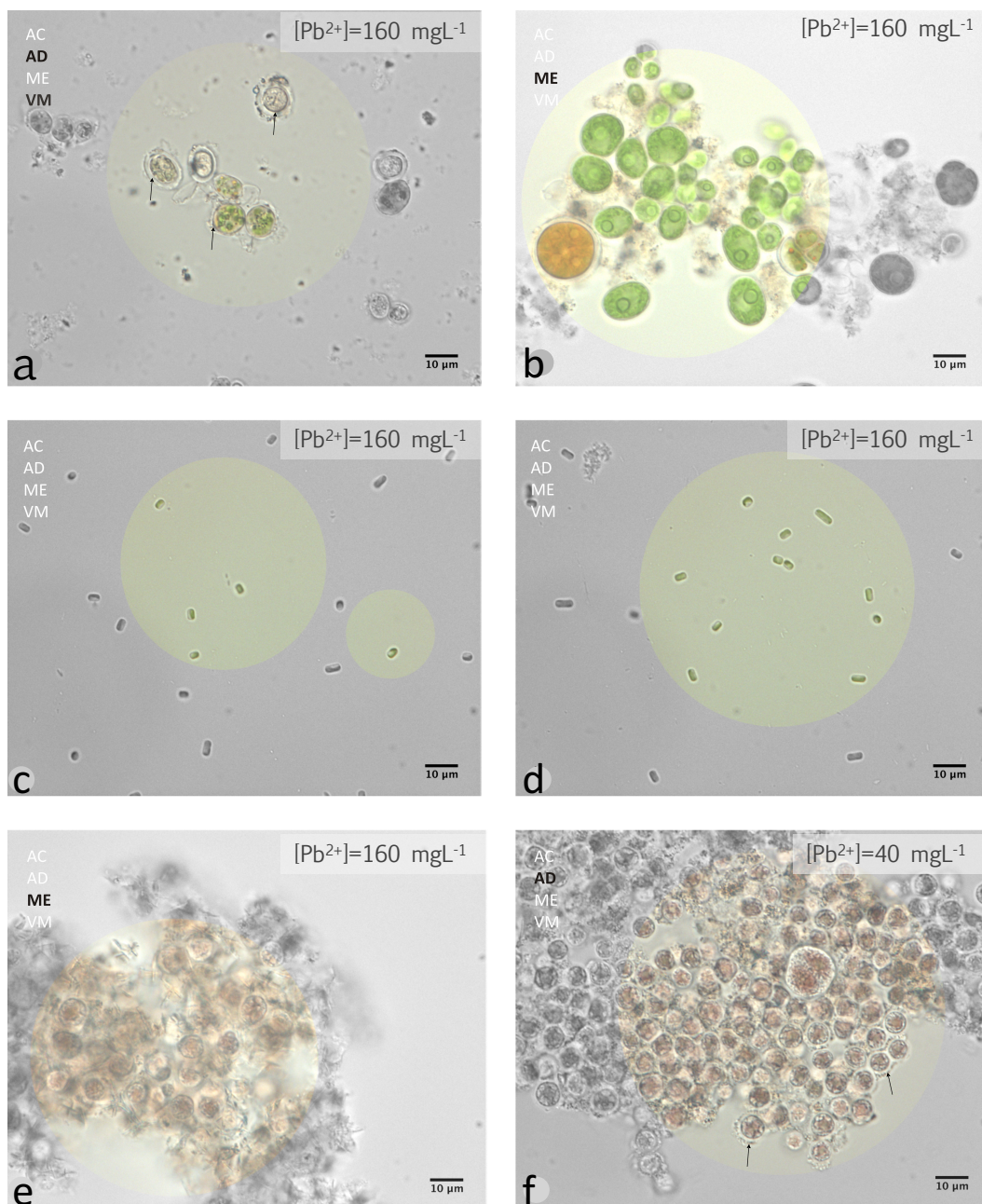


Figura 52. Micrografías de los aislados expuestos a distintas concentraciones de $[Pb^{2+}]$: a) *Coelastrella* sp. pH7; b) *Coelastrella* sp. pH4; c) *S. bacillaris* pH7; d) *S. bacillaris* pH4; e) y f) *Porphyridium* sp. pH7. En negro lo que se observa en la micrografía: AC=agregación celular; AD=adsorción; ME=mucílago extracelular; VM=variación morfométrica.



Según los datos obtenidos en este apartado, se pueden ordenar las muestras según la tolerancia observada frente a las diferentes concentraciones de plomo a las que se han expuesto los aislados: *Coelastrella* sp. a pH 4 > *Trebouxiophyceae* sp. pH7 > *Porphyridium* sp. > *Trebouxiophyceae* sp. pH4 > *Parachlorella* sp. pH4 > *Parachlorella* sp. pH7 > *T. obliquus* pH4 > *Coelastrella* sp. pH7 > *S. bacillaris* pH7 > *T. obliquus* pH7 > *S. bacillaris* pH4. En la literatura, al igual que en los casos anteriores, el cálculo de índice IC_{50} es uno de los parámetros más utilizados para describir la tolerancia de los microorganismos frente a este metal. Los valores encontrados en otros trabajos correspondientes a este índice, pueden abarcar un rango muy amplio. Comprándolos con los obtenidos en nuestro estudio (entre 32 y 74 mgL^{-1}), por ejemplo, se encuentran algunos en el mismo rango, como en la microalga *Chlorella sorokiniana* con un IC_{50} ⁹ de 46 mgL^{-1} (Liang y col., 2017), en los cultivos de *Chlorella protothecoides*¹⁰ de 53 mgL^{-1} o en el de *Chlorella vulgaris*¹¹ de 56,51 mgL^{-1} (Zhang y col., 2013b), y en otros estudios valores mucho menores como por ejemplo para las microalgas *Tetraselmis chuii* (IC_{50} ¹¹=2,64 mgL^{-1}), *Rhodomonas salina* (IC_{50} ¹¹=0,90 mgL^{-1}), *Chaetoceros* sp. (IC_{50} ¹¹=0,11 mgL^{-1}), *Isochrysis galbana* (IC_{50} ¹¹=1,34 mgL^{-1}) y *Nannochloropsis gaditana* (IC_{50} ¹¹=0,74 mgL^{-1}) (Debelius y col., 2009). Por microscopía se observan variaciones morfológicas en *Trebouxiophyceae* sp., *T. obliquus* y en *Coelastrella* sp. cultivadas a los dos pHs, y la producción de un mucílago extracelular en todos los cultivos menos que en *S. bacillaris*. El medio acuático es uno de los ambientes más expuestos a los contaminantes, debido a que las descargas, sean por vía terrestre, acuático-terrestre o atmosférica, tienen como receptáculo final el ambiente marino (Acuña-González y col., 2004; Rojas de Astudillo y col., 2005). En estos sistemas las microalgas constituyen el principal componente del fitoplancton que soporta la cadena trófica, de esta manera, un cambio, sea cualitativo o cuantitativo, producido por un contaminante, podría repercutir drásticamente en el ecosistema (Nalewajko y Olaveson, 1998; Franklin y col., 2000). También, siendo uno de los primeros grupos afectados por la contaminación por metales, proporcionan información importante para predecir el impacto ambiental de la contaminación. (Kagalou y col., 2002). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se podía concluir que los aislados con mejor tolerancia a los distintos metales fueron: *Trebouxiophyceae* sp., *Parachlorella* sp. cultivados a pH7 y *Porphyridium* sp. Las variaciones morfométricas con respecto al control se observaron especialmente en presencia de cobre y hierro en todos los cultivos menos que en *S. bacillaris*. En la mayoría de los cultivos tratados se observó la producción de un mucílago extracelular no presente en el control, estrategia ya descrita por otros autores para reducir la biodisponibilidad de metal en el medio (Bossuyt y Janssen, 2004). Se observó adsorción para los metales Cd y Pb a pH7 en los cultivos de *Parachlorella* sp. y *Coelastrella* sp. En el caso del Fe a pH7 para *Parachlorella* sp. y *T. obliquus* sp. y a pH7 y pH4 en el aislado correspondiente a *Coelastrella* sp. Todas las microalgas aisladas presentaron eliminación de los metales ensayados del medio de cultivo a los diferentes pHs, siendo

⁹ IC_{50} a las 96h

¹⁰ IC_{50} a los 14 días, al igual que en nuestro estudio.

¹¹ IC_{50} a las 72h

Parachlorella sp. y *Trebouxiophyceae* sp. las más eficientes. La dificultad de comparar los datos obtenidos con el trabajo de otros autores ha residido principalmente en tres aspectos: i) la distinta medición del efecto del metal pesado sobre el cultivo de microalga, ii) la concentración inicial de las células, que afecta a la toxicidad del metal en el cultivo, iii) las diferencias en los medios de cultivo y en las sales de metales utilizadas. En relación a los resultados de la microscopía óptica, los fenómenos observados se han descrito en otros estudios, especialmente la producción del mucílago extracelular como consecuencia de la exposición de las microalgas a metales y metales pesados, induciendo una reducción en la biodisponibilidad del metal y su absorción (Holzinger y Pichrtov, 2016). Otros autores han descrito un aumento considerable en la liberación de exopolisacáridos y proteínas extracelulares, en cultivos de la cianobacteria *Lyngbya putealis*, como respuesta a la presencia de Cu y Co (Kiran y Kaushik, 2008) y en cultivos de *Thalassiosira weissflogii* y *Thalassiosira pseudonana* en presencia de iones Ag (Miao y col., 2007) y Cd (Zhang y col., 2013b). Estos polímeros poseen diferentes propiedades que pueden utilizarse con diferentes fines médicos y biotecnológicos observándose actividad antiviral, antitumoral, anticoagulante, antiinflamatoria e inmunoestimulante, pero también pueden servir como biosurfactantes, biolubricantes, bioemulsificantes y una fuente de azúcares para los biocombustibles (Rajvanshi y Sharma, 2012). Todo ello potencia el estudio con fines biotecnológicos de las microalgas.

4.2.2.1.5 Ensayo preliminar de biorremediación

Teniendo en cuenta los resultados de la exposición a distintos metales descritos, se consideró de interés realizar algún experimento preliminar que permitiera evaluar el interés de las microalgas aisladas en biorremediación de aguas contaminadas con metales. Para ello se seleccionaron los cultivos de microalgas expuestas a hierro y a cobre. En dichos cultivos se midió por TXRF la concentración de los iones metálicos presentes en el medio de cultivo tras 15 días de crecimiento, y se compararon con las concentraciones a tiempo cero en las concentraciones indicadas en el anexo II, tabla 3. Con estos valores se determinó el porcentaje de eliminación del metal del medio, cuyos resultados se muestran en la tabla 14. Si bien los resultados obtenidos requieren de estudios complementarios se puede concluir que todos los aislados son capaces de eliminar del medio hierro y cobre eficientemente. Para el hierro salvo en el caso de *Coelastrella* sp. que solo eliminó del medio un 47% de hierro a pH7 el resto de los aislados alcanzaron porcentajes de eliminación superiores al 60% tanto a pH4 como a pH7. *Parachlorella* sp. y *Trebouxiophyceae* sp. fueron muy eficaces, retirando más del 93.9% del metal en ambos pH, y siendo especialmente remarcable el resultado obtenido a pH7, que llegó a 99% en ambos casos. Porcentajes de 86 y 95% fueron obtenidos con *S. bacillaris* a pH4 y pH7. La diferencia en el pH influyó en la retirada del hierro del medio en los cultivos *T. obliquus* y *Coelastrella* sp., donde en el caso de *T. obliquus* se observaron valores mayores en el porcentaje de eliminación del hierro a pH7 con respecto a pH4 (respectivamente de 94% y 62%) y en el de *Coelastrella* sp. en el que la eliminación del hierro del medio fue mayor a pH4 (91%) que a pH7 (47%).

Tabla 14. Eliminación del metal del medio (EM) del metal al día 15 con respecto al día 0.

Cultivo	pH	Porcentajes EM (%)	
		Cu ²⁺	Fe ²⁺
<i>Parachlorella</i> sp.	7	71,80	98,60
	4	72,80	93,90
<i>Trebouxiphyaceae</i> sp.	7	92,90	98,80
	4	77,90	95,10
<i>T. obliquus</i>	7	73,40	93,50
	4	54,20	62,80
<i>Coelastrella</i> sp.	7	66,10	47,00
	4	53,40	91,30
<i>S. bacillaris</i>	7	58,30	95,50
	4	79,10	86,00
<i>Porphyridium</i> sp.	7	ND	86,40

En el caso del cobre, los porcentajes de eliminación fueron inferiores a los obtenidos para el hierro, excepto con el aislado *Trebouxiphyaceae* sp. a pH7, que consiguió eliminar el 92,9% del metal presente en el medio. Los valores obtenidos a pH7 fueron superiores a los de pH4, excepto para *S. bacillaris*. Excepto para *Porphyridium* sp., todos los porcentajes de remoción de cobre fueron superiores al 50%, siendo el máximo del 92,9% con *Trebouxiphyaceae* sp. Valorando los resultados totales del este ensayo, el cultivo más eficaz para la remoción del cobre fue el aislado *Trebouxiphyaceae* sp. Estos resultados, aunque preliminares, aconsejan profundizar en la posible utilización de las microalgas aisladas para la eliminación de metales en ambientes acuosos y a pHs ácidos que facilitan la solubilidad de los mismos.

4.2.2.2 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

Para la producción biológica de AgNPs se utilizaron los caldos de los cultivos de las microalgas según se describe en el apartado 3.5.3.2 de materiales y métodos. Cuando se añadió AgNO_3 a la concentración final requerida de 1 mM a los caldos de *Porphyridium* sp. cultivado en medio L1, se observó la aparición de un precipitado blanco-grisáceo, que podría ser de AgCl debido a los altos niveles de Cl^- que contiene este medio (>300 mM Cl^-), por lo que se descartó el uso de caldos de esta alga para los ensayos de producción de AgNPs. Este efecto no se observó con el medio BG11 en el que se cultivaron las demás microalgas. En este caso se tomaron muestras de cada cultivo correspondientes a las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. En la tabla 15 se resume la nomenclatura empleada para las muestras estudiadas.

Tabla 15. Muestras de AgNPs utilizadas en este trabajo.

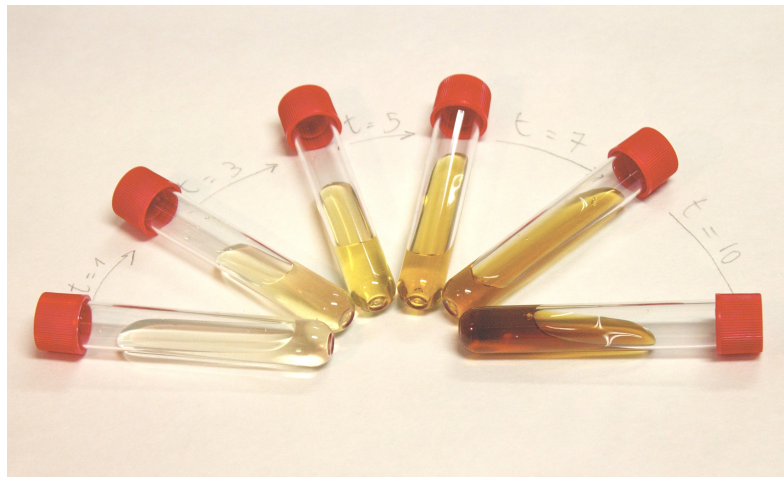
Aislado	pH	Fase de crecimiento del cultivo	Nomenclatura de la muestra
<i>Parachlorella</i> sp.	4	exponencial	Para_4_exp
<i>Parachlorella</i> sp.	4	estacionaria	Para_4_est
<i>Parachlorella</i> sp.	7	exponencial	Para_7_exp
<i>Parachlorella</i> sp.	7	estacionaria	Para_7_est
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	4	exponencial	Treb_4_exp
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	4	estacionaria	Treb_4_est
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	7	exponencial	Treb_7_exp
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	7	estacionaria	Treb_7_est
<i>T. obliquus</i>	4	exponencial	Obli_4_exp
<i>T. obliquus</i>	4	estacionaria	Obli_4_est
<i>T. obliquus</i>	7	exponencial	Obli_7_exp
<i>T. obliquus</i>	7	estacionaria	Obli_7_est
<i>Coelastrella</i> sp.	4	exponencial	Coel_4_exp
<i>Coelastrella</i> sp.	4	estacionaria	Coel_4_est
<i>Coelastrella</i> sp.	7	exponencial	Coel_7_exp
<i>Coelastrella</i> sp.	7	estacionaria	Coel_7_est
<i>S. bacillaris</i>	4	exponencial	Baci_4_exp
<i>S. bacillaris</i>	4	estacionaria	Baci_4_est
<i>S. bacillaris</i>	7	exponencial	Baci_7_exp
<i>S. bacillaris</i>	7	estacionaria	Baci_7_est

4.2.2.2.1 Cinética de producción y estabilidad de las AgNPs

La formación, cinética y estabilidad de las nanopartículas se siguió *de visu* y espectrofotométricamente gracias a la aparición de color que caracteriza su formación (Philip: 2011; Henglein: 1993). Tras la adición de Ag^+ a los caldos y exposición a la luz se observó un cambio gradual de color desde incoloro hasta marrón, tal y como se observa en la figura 53, lo que es característico de la formación de nanopartículas

de plata metálica (Ag^0) y del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie (SPR) (Sanghi y Verma, 2009).

Figura 53. Cambio gradual de color durante el proceso de síntesis de AgNPs con caldo del aislado *Trebouxiphyceae* sp.



Las preparaciones mantenidas en oscuridad no dieron lugar a cambios de color y por tanto la producción de nanopartículas fue fotodependiente, como en la mayor parte de los estudios descritos de producción biológica de AgNPs (Le y col., 2012; Berthold y col., 2015; Javani y col., 2015; da Silva Ferreira y col., 2017).

Tabla 16. Características de las AgNPs producidas con los caldos de microalgas. $\lambda_{\text{máx}}$: longitud de onda de máxima absorbancia; $t_{\text{máx}}$ DO: tiempo requerido para alcanzar la máxima producción de AgNPs; t bajada: tiempo en el que se empieza a producir la degradación/agregación de las AgNPs.

Muestra	$\lambda_{\text{máx}}$	$t_{\text{máx}}$ DO (h)	t bajada (h)	Máx DO
Para_4_exp	446	3	4	2,96
Para_4_est	428	3	6	3,66
Para_7_exp	434	3	4	2,43
Para_7_est	422	7	8	5,07
Treb_4_exp	455	4	5	2,39
Treb_4_est	430	2	7	5,45
Treb_7_exp	434	3	4	2,3
Treb_7_est	457	6	8	3,17
Obli_4_exp	447	3	4	2,49
Obli_4_est	425	6	7	4,47
Obli_7_exp	457	3	4	2,63
Obli_7_est	438	5	7	3,83
Coel_4_exp	455	4	5	2,39
Coel_4_est	430	2	7	5,45
Coel_7_exp	434	3	4	2,3
Coel_7_est	457	6	8	3,17
Baci_4_exp	407	3	4	2,78
Baci_4_est	456	4	6	1,91
Baci_7_exp	416	2	4	2,76
Baci_7_est	423	6	7	3,43

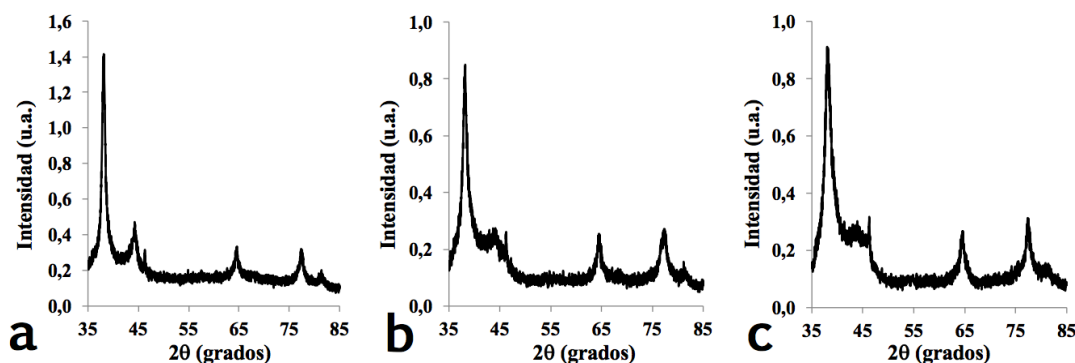
Las longitudes de onda máximas del espectro UV-Vis de las nanopartículas producidas varían desde los 410 nm (Baci_4_exp) a los 460 nm (Treb_7_est).

Respecto a la cinética de formación de las nanopartículas (Figs. 57-61, columna 1), de manera general se observa que las muestras obtenidas con caldos de fase exponencial alcanzaron valores máximos de absorbancia en aproximadamente 3 h, mientras que los caldos de fase estacionaria necesitaron para una producción máxima de AgNPs un tiempo mayor, de hasta 7 h. Adicionalmente, se observa que los espectros registrados son más estrechos para las AgNPs procedentes de caldos de la fase estacionaria, lo que podría indicar una menor dispersión de tamaños de las nanopartículas en estas preparaciones como ha sido sugerido por otros autores (Govindaraju y col., 2009; Jena y col., 2013). El tiempo de incubación a partir del cual se inicia la degradación/agregación de las nanopartículas, observado por espectrofotometría como la disminución de la absorbancia a la $\lambda_{\text{máx}}$, y visible por el cambio de color de marrón a gris, fue de 4 h para casi todas las muestras procedentes de caldos de fase exponencial, sin apreciarse diferencias entre los dos pHs, y de hasta 8 h para las preparaciones con caldos de fase estacionaria, siendo las de pH 7 ligeramente más estables que las obtenidas a pH 4 (Tab. 16).

4.2.2.2 Caracterización físico-química

La composición de las nanopartículas se determinó mediante TXRF, comprobándose la estructura cristalina por XRD. Los análisis mediante TXRF mostraron la presencia mayoritaria de plata en las nanopartículas. Aunque esta tecnología no permite distinguir entre formas de plata iónica o elemental se utilizó tanto para determinar la composición de las nanopartículas, así como para determinar la concentración de este metal en las preparaciones de nanopartículas lavadas utilizadas en los experimentos para la determinación de la actividad antibacteriana que se describen a continuación en el apartado 4.2.2.3. Los espectros de difracción de rayos X (XRD) obtenidos muestran cuatro bandas de difracción a valores de ángulo 2θ de 38° , 44° , 64° y 77° , que corresponden a un patrón propio de una estructura cristalina cúbica centrada en las caras (JCPDS ficha 04-0783) típica de la plata elemental. Se eligieron al azar las muestras Para_exp_7, Stic_exp_7 y Obli_est_4, como ejemplo (Fig. 54).

Figura 54. Espectros XRD de AgNPs; a) Para_exp_7; b) Stic_exp_7 y c) Obli_est_4.



4.2.2.2.1 Caracterización morfológica

Las imágenes de TEM se utilizaron para determinar las formas y los tamaños de las AgNPs y estudiar el grado de dispersión de éstos. Las micrografías representativas de las muestras analizadas se muestran en la columna central de las figuras 55-59. Los resultados de las medidas de los tamaños y los índices de dispersión (PDI), calculados según se indica en el apartado 3.5.3.2.2 de materiales y métodos, se recogen en la tabla 18. Como se puede observar (Figs. 55-59, columna central) la mayor parte de las nanopartículas muestran una forma esférica, aunque en algunos casos (Figs. 55a2, 56a2 y d2, 57a2, b2, 57c2 y d2, 58a2, b2, c2 y d2, 59a2, b2 y d2) se han detectado minoritariamente otras morfologías tales como triangular, pentagonal, hexagonal o cuadrada principalmente.

Los tamaños mostrados en la tabla 17 y en los histogramas (Figs. 55-59, columna derecha) representan el 95% de las nanopartículas observadas en las micrografías, apareciendo nanopartículas de mayores tamaños que ya no se definen como nanopartículas o cuya cantidad es despreciable para el cálculo de la distribución, pero que se presentan en las fotos circulares en la columna central como dato adicional. Los tamaños medios varían entre los 6,6 nm (Para_4_est) y los 17,5 nm (Baci_4_exp) de diámetro (tabla 18), con rangos para *Parachlorella* sp. de 6,6-7,8 nm, para *Coelastrella* sp. de 7,2-17,5 nm, para *Trebouxiphyceae* sp. de 8,2-14,5 nm, para *T. obliquus* de 7,6-16,1 nm y *S. bacillaris* de 10-17 nm. En buena parte de otros estudios de producción de AgNPs por microalgas se obtuvieron materiales con diámetros en rangos similares o algo mayores a los producidos por nuestros aislados. Así por ejemplo con *Chlamydomonas* sp. 5-15 nm (Barwal y col., 2011), con *Coelastrum* sp. 13-31 nm (Berthold y col., 2015) con extractos de *Dictyosphaerium* sp. 15-30 nm y con los de *Pectinodesmus* sp. 50-65 nm (Khalid y col., 2017).

El índice de dispersión (PDI) es una medida de la diversidad de los tamaños encontrados en cada muestra. Para valores de este índice de 0-0,1 la preparación de AgNPs se considera monodispersa, de 0,1-0,4 moderadamente polidispersa y de >0,4 altamente polidispersa (Merkus, 2009). De manera general, podemos observar una mayor agregación de las nanopartículas en las muestras procedentes de los cultivos en fase exponencial. Se observa que, en la mayoría de los casos, las nanopartículas producidas a partir de cultivos en fase exponencial, exhiben unos tamaños medios mayores respecto a sus homólogos obtenidos en fase estacionaria. El grado de dispersión de los tamaños de las nanopartículas presentes en una preparación es un parámetro relevante a tener en consideración en cuanto a sus posibles aplicaciones, ya que cuanto menor sea el grado de dispersión más fácil resulta el relacionar sus propiedades con sus características estructurales (Merkus, 2009; Ivask y col., 2014). La obtención de nanopartículas con determinados tamaños que les confieran propiedades concretas no es siempre posible, incluso cuando se utilizan métodos químicos (Ghaemi y Gholamipour, 2017).

Tabla 17. Diámetro medio e Índice de Dispersión (PDI) de las AgNPs.

Muestra	Diámetro \pm DE (nm)	PDI
Para_4_exp	8,19 \pm 3,3	0,17
Para_4_est	6,56 \pm 2,0	0,10
Para_7_exp	12,69 \pm 4,0	0,14
Para_7_est	7,79 \pm 3,1	0,17
Treb_4_exp	14,46 \pm 8,6	0,36
Treb_4_est	8,32 \pm 3,8	0,21
Treb_7_exp	10,68 \pm 3,9	0,14
Treb_7_est	8,16 \pm 3,8	0,22
Obli_4_exp	16,09 \pm 6,6	0,17
Obli_4_est	8,89 \pm 5,9	0,45
Obli_7_exp	14,97 \pm 6,3	0,18
Obli_7_est	7,65 \pm 3,3	0,19
Coel_4_exp	9,25 \pm 4,1	0,20
Coel_4_est	11,41 \pm 6,2	0,14
Coel_7_exp	17,48 \pm 9,9	0,32
Coel_7_est	7,21 \pm 2,7	0,15
Baci_4_exp	17,54 \pm 6,4	0,13
Baci_4_est	10,37 \pm 4,3	0,17
Baci_7_exp	17,10 \pm 5,0	0,09
Baci_7_est	10,41 \pm 4,2	0,17

Sin embargo se suele considerar que en el caso de nanopartículas sintetizadas mediante el empleo de sustancias o extractos de origen biológico es aún menos frecuente el poder obtener partículas monodispersas (Sintubin y col., 2012). En nuestro estudio los valores del índice de dispersión en la mayoría de los casos se encuentran entre 0,1-0,4, indicando que estas nanopartículas son moderadamente dispersas. Por el contrario, las AgNPs obtenidas con caldos de cultivos a pH 4 de *Parachlorella* sp. en fase estacionaria y las del cultivo de *S. bacillaris* a pH 7 en fase exponencial se podrían considerar monodispersas. En el otro extremo se encontrarían las producidas por caldos de cultivos a pH 4 de *T. obliquus* en fase estacionaria que genera AgNPs altamente polidispersas con un PDI superior a 0,4.

Siguen, agrupadas por cultivo, las figuras relativas a los resultados obtenidos: i) tras el seguimiento de la cinética de las diferentes muestras en la columna izquierda, ii) de las micrografías obtenidas por TEM en la columna central e, iii) en la columna de la derecha, los histogramas con la distribución de tamaños medida para cada una de las muestras.

Figura 55. Caracterización de la producción de AgNPs por caldos procedentes del cultivo del aislado de *Parachlorella* sp. Columna izquierda, cinéticas de formación de AgNPs; columna central, micrografías de TEM; columna derecha, frecuencias de nanopartículas según sus diámetros. En cada columna: a) Para_4_exp, b) Para_4_est, c) Para_7_exp, d) Para_4_exp.

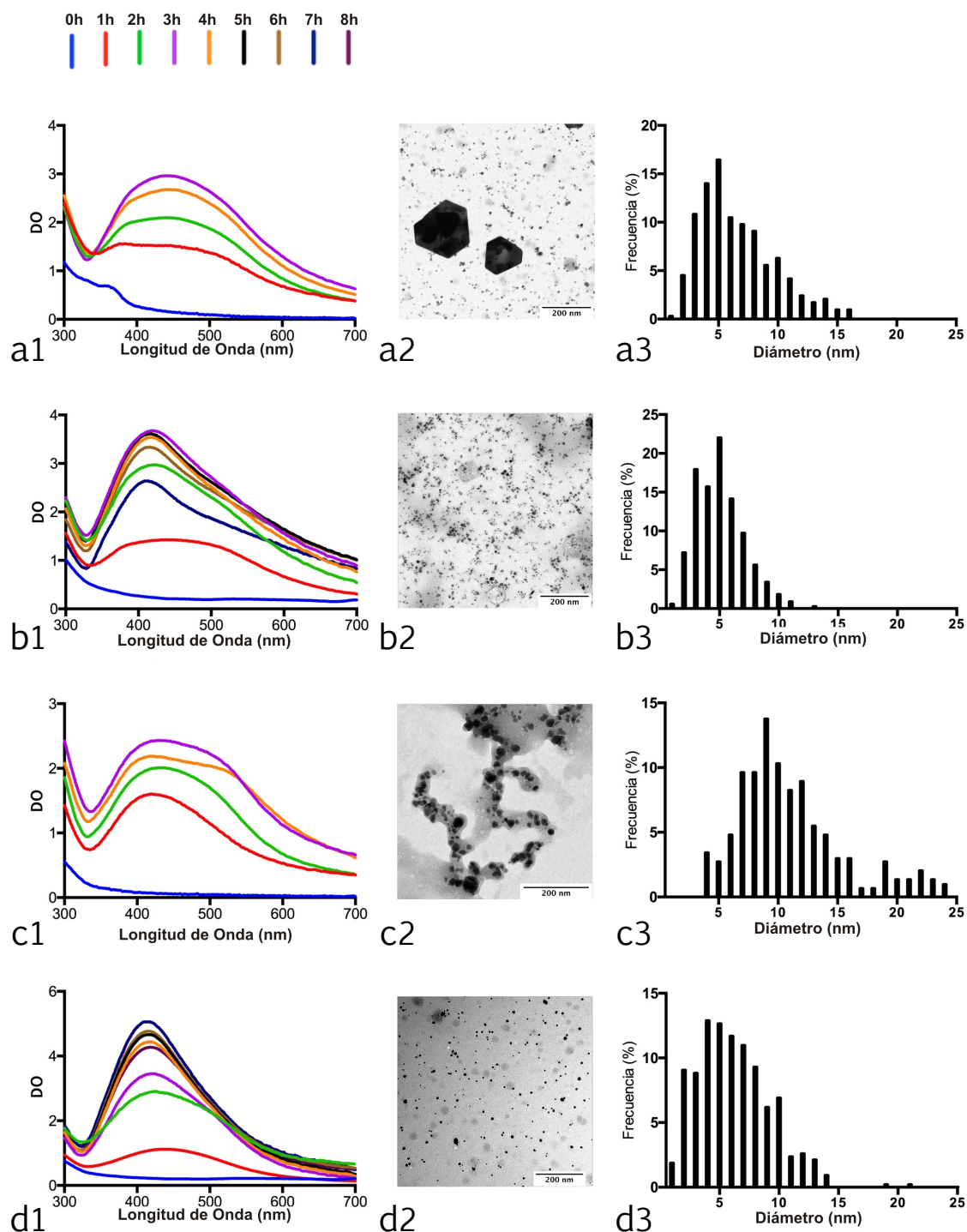


Figura 56. Caracterización de la producción de AgNPs por caldos procedentes del cultivo del aislado de *Trebouxiphyceae* sp. Columna izquierda, cinéticas de formación de AgNPs; columna central, micrografías de TEM; columna derecha, frecuencias de nanopartículas según sus diámetros. En cada columna: a) Treb_4_exp, b) Treb_4_est, c) Treb_7_exp, d) Treb_4_exp.

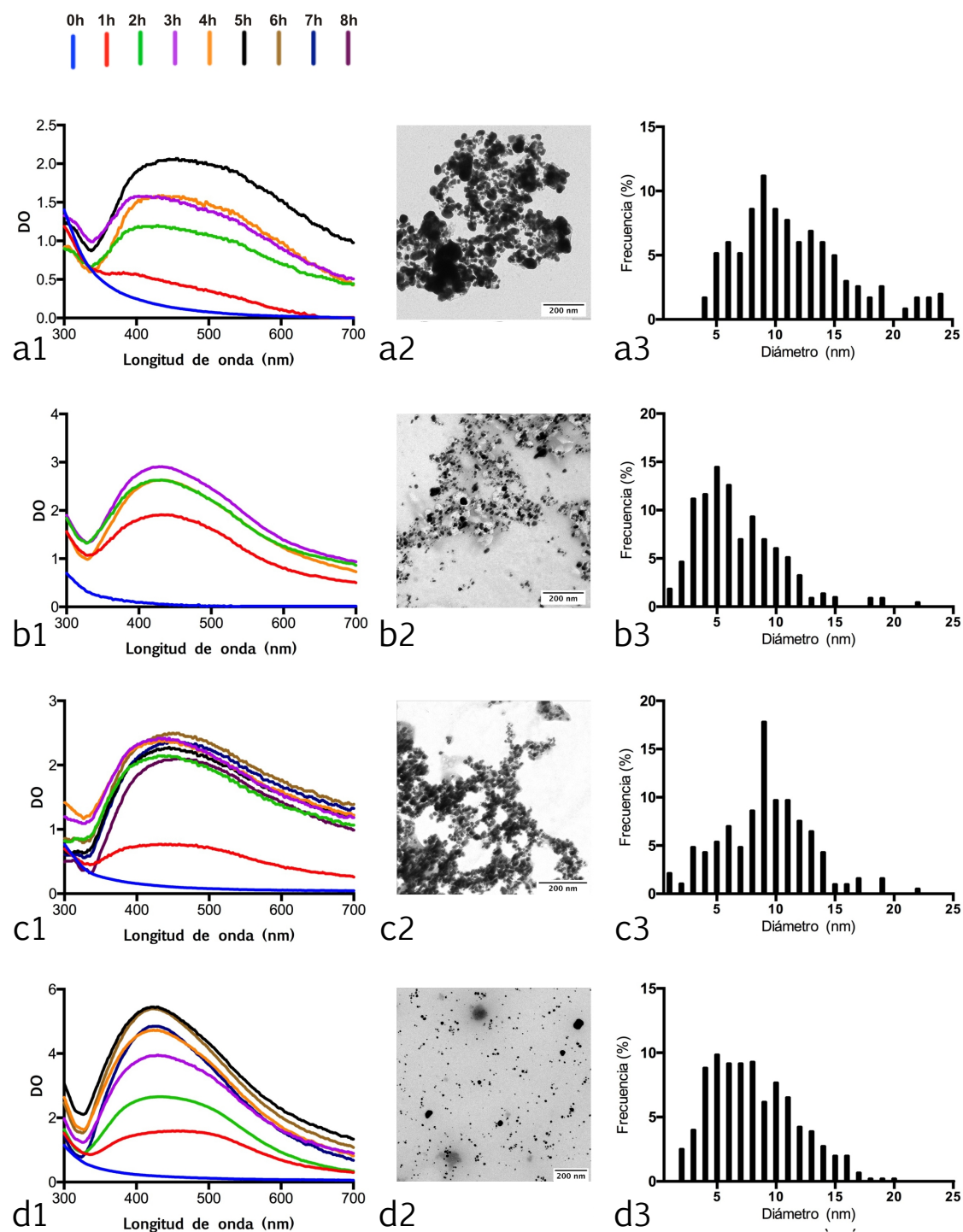


Figura 57. Caracterización de la producción de AgNPs por caldos procedentes del cultivo del aislado de *T. obliquus*. Columna izquierda, cinéticas de formación de AgNPs; columna central, micrografías de TEM; columna derecha, frecuencias de nanopartículas según sus diámetros. En cada columna: a) Obli_4_exp, b) Obli_4_est, c) Obli_7_exp, d) Obli_4_exp.

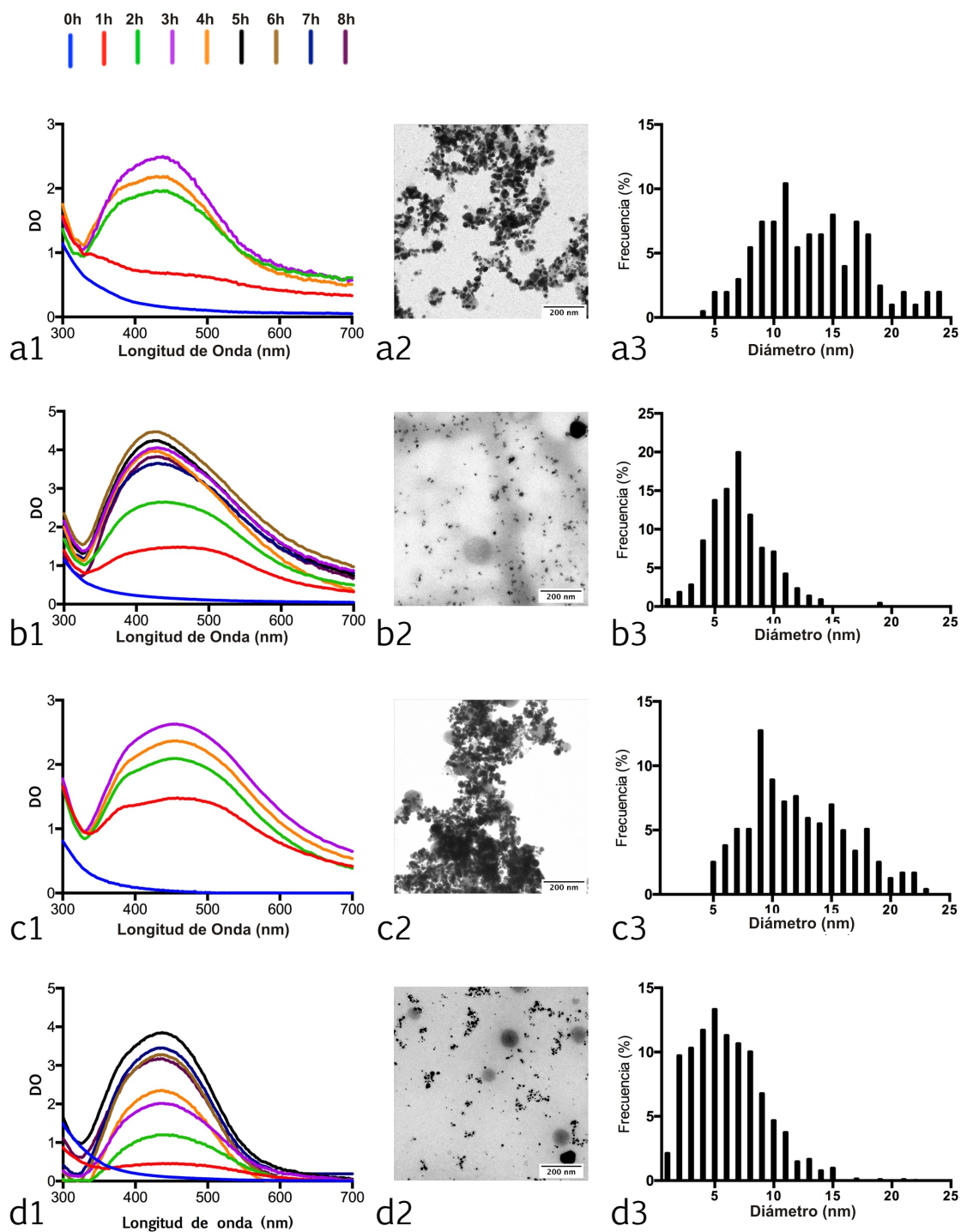


Figura 58. Caracterización de la producción de AgNPs por caldos procedentes del cultivo del aislado de *Coelastrella* sp. Columna izquierda, cinéticas de formación de AgNPs; columna central, micrografías de TEM; columna derecha, frecuencias de nanopartículas según sus diámetros. En cada columna: a) Coel_4_exp, b) Coel_4_est, c) Coel_7_exp, d) Coel_4_exp.

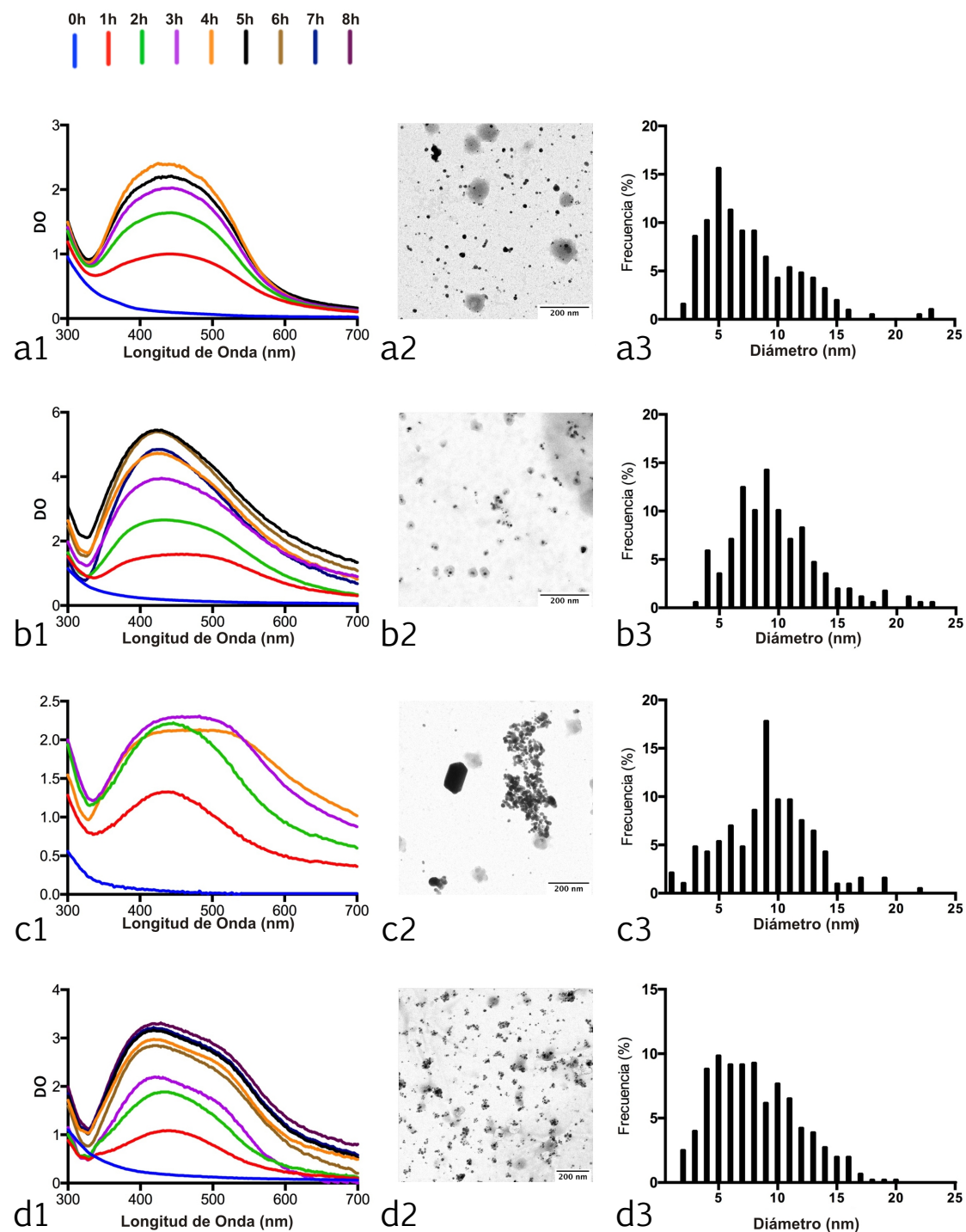
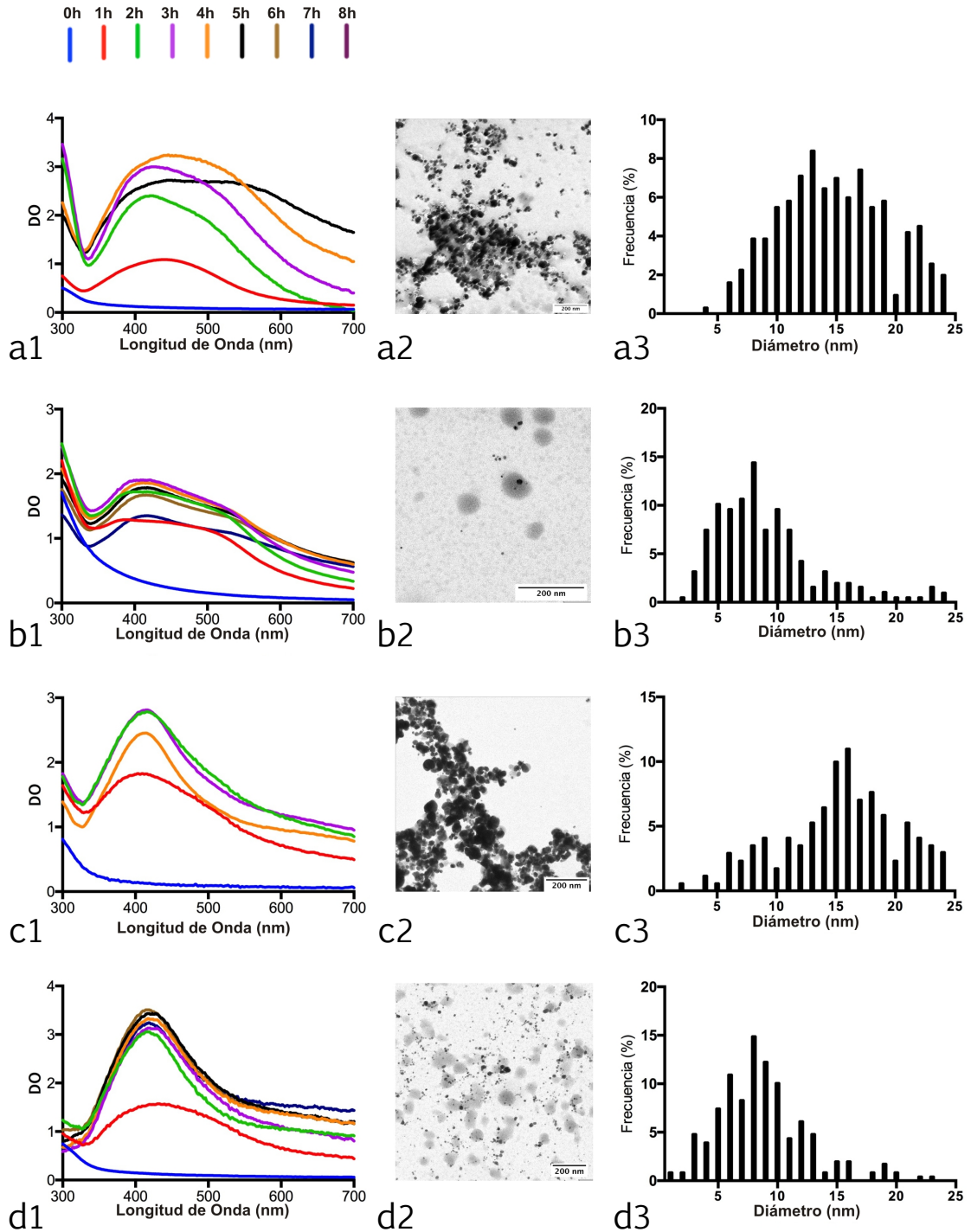


Figura 59. Caracterización de la producción de AgNPs por caldos procedentes del cultivo del aislado de *S. bacillaris* sp. Columna izquierda, cinéticas de formación de AgNPs; columna central, micrografías de TEM; columna derecha, frecuencias de nanopartículas según sus diámetros. En cada columna: a) Baci_4_exp, b) Baci_4_est, c) Baci_7_exp, d) Baci_4_exp.



4.2.2.3 Actividad antibacteriana

Entre las propiedades más importantes de las nanopartículas de plata se encuentra su posible actividad antibacteriana, por lo que se realizaron experimentos para determinar la de las AgNPs obtenidas en este trabajo.

Los resultados de los experimentos de actividad antibacteriana se han comparado en cuanto a los valores de la IC_{50} para las distintas AgNPs frente a tres bacterias *E. coli* (Gram negativa), *K. pneumoniae* (Gram negativa), y *S. epidermidis* (Gram positiva). A partir de los experimentos realizados, se han determinado los valores de concentración inhibitoria IC_{50} (Tab. 18). En la figura 60, en la que se puede apreciar que las nanopartículas obtenidas a partir de caldos de *T. obliquus* son las menos activas frente a las tres bacterias testigo utilizadas, a excepción de las Obli_4_exp. Casi todas las nanopartículas producidas son más activas frente a la bacteria Gram positiva *S. epidermidis*., independientemente de si los caldos proceden de fases exponenciales o estacionarias o del pH del medio empleado (Tab. 19, Fig. 60).

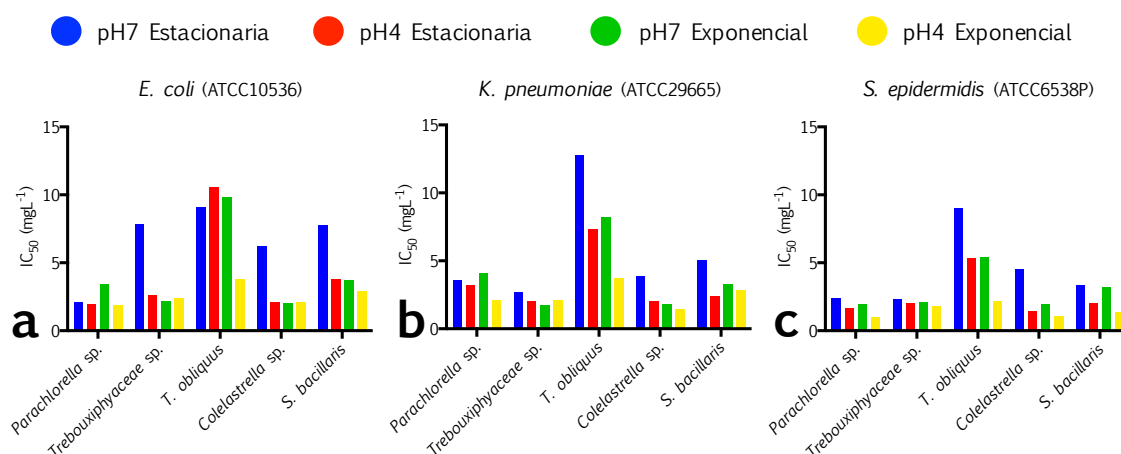
Tabla 18. Resultados relativos al cálculo del IC_{50} en las muestras analizadas en este ensayo.

Muestra	IC_{50} <i>E. coli</i> mgL ⁻¹	IC_{50} <i>K. Pneumoniae</i> mgL ⁻¹	IC_{50} <i>S. epidermidis</i> mgL ⁻¹
Para_4_exp	1,90	2,07	0,98
Para_4_est	1,92	3,16	1,66
Para_7_exp	3,42	4,05	1,94
Para_7_est	2,06	3,56	2,38
Treb_4_exp	2,40	2,08	1,81
Treb_4_est	2,60	2,02	1,97
Treb_7_exp	2,16	1,72	2,09
Treb_7_est	7,81	2,71	2,32
Obli_4_exp	3,77	3,67	2,13
Obli_4_est	10,56	7,33	5,33
Obli_7_exp	9,77	8,20	5,36
Obli_7_est	9,11	12,74	8,98
Coel_4_exp	2,05	1,42	1,07
Coel_4_est	2,07	2,03	1,42
Coel_7_exp	1,96	1,76	1,93
Coel_7_est	6,19	3,87	4,49
Baci_4_exp	2,92	2,79	1,35
Baci_4_est	3,81	2,40	2,01
Baci_7_exp	3,66	3,23	3,16
Baci_7_est	7,76	4,99	3,31

Las AgNPs sintetizadas con caldos de *Parachlorella* sp. mostraron frente a *E. coli* valores de IC_{50} de 1,9-3,42 mgL⁻¹, mientras que para las procedentes de *Trebouxiphyceae* sp., y *Coelastrella* sp. aunque los valores estuvieron en un rango muy parecido, se observó una excepción con las procedentes de caldos de la fase estacionaria y a pH 7, que fueron notablemente menos activas. También en el caso de las AgNPs producidas a partir de *S. bacillaris* en esas últimas condiciones el IC_{50} fue notablemente mayor que para las de las demás preparaciones obtenidas a partir de esta microalga. En casi todos los casos y frente a las tres bacterias testigo las nanopartículas menos activas fueran las obtenidas con caldos de fase estacionaria y

a pH 7, a excepción de las de *Parachlorella* sp. frente a las Gram negativas. En general, las nanopartículas más activas frente a las tres bacterias testigos fueron, entre las obtenidas con cada microalga, las preparadas a pH 4, y entre estas las de la fase exponencial. Como se puede observar (Tab. 18), la actividad frente a las dos bacterias Gram negativas usadas en este estudio no es homogénea, sino que para algunas nanopartículas los IC_{50} son mayores frente a *E. coli* que frente a *K. pneumoniae*, pero para otras el resultado es el inverso. Esto está de acuerdo con estudios anteriores realizados por nuestro grupo (Javani y col. 2015) así como con otros descritos en la literatura (Marambio-Jones y Hoek, 2010; Berthold y col., 2015) indicando que la actividad antibacteriana de las AgNPs no solo depende de si las bacterias son Gram positivas o Gram negativas sino que también pueden afectar a cada especie concreta, e incluso cada cepa concreta, de forma diferente.

Figura 60. IC_{50} de las AgNPs frente a las bacterias testigo *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. epidermidis*.



Existen escasos estudios sobre la actividad antibacteriana ejercitada por nanopartículas de plata cuya síntesis está mediada por microalgas (Sharma y col., 2009; Berthold y col., 2015; da Silva Ferreira y col., 2017; Khalid y col., 2017). En la mayoría de los estudios más recientes, no observan diferencias entre la actividad antibacteriana frente a Gram negativas y a Gram positivas (Merin y col., 2010; Agnihotri y col., 2014; Berthold y col., 2015; da Silva Ferreira y col., 2017; Khalid y col., 2017) y hay trabajos que sugieren que los factores de toxicidad son muy diversos y que la fisiología y la genómica de cepas bacterianas jueguen un papel importante. Por ejemplo, se observó que la respuesta de diferentes cepas bacterianas, incluso de la misma especie, era diferente para las mismas AgNPs (Ashraf y col., 2014). Por lo general, no se observa una relación directa entre el tamaño de las nanopartículas producidas y la actividad antibacteriana, a pesar de que diversos estudios sugieran que las nanopartículas más pequeñas tendrían un mayor efecto bactericida (Morones y col., 2005; Ivask y col., 2014). Una razón posible podría ser que el núcleo de plata no interactúa directamente con las células bacterianas, sino a través de la corona que contiene diferentes compuestos orgánicos, dependiendo de la mezcla particular de los compuestos presentes en los caldos o de los extractos utilizados en la síntesis de nanopartículas.

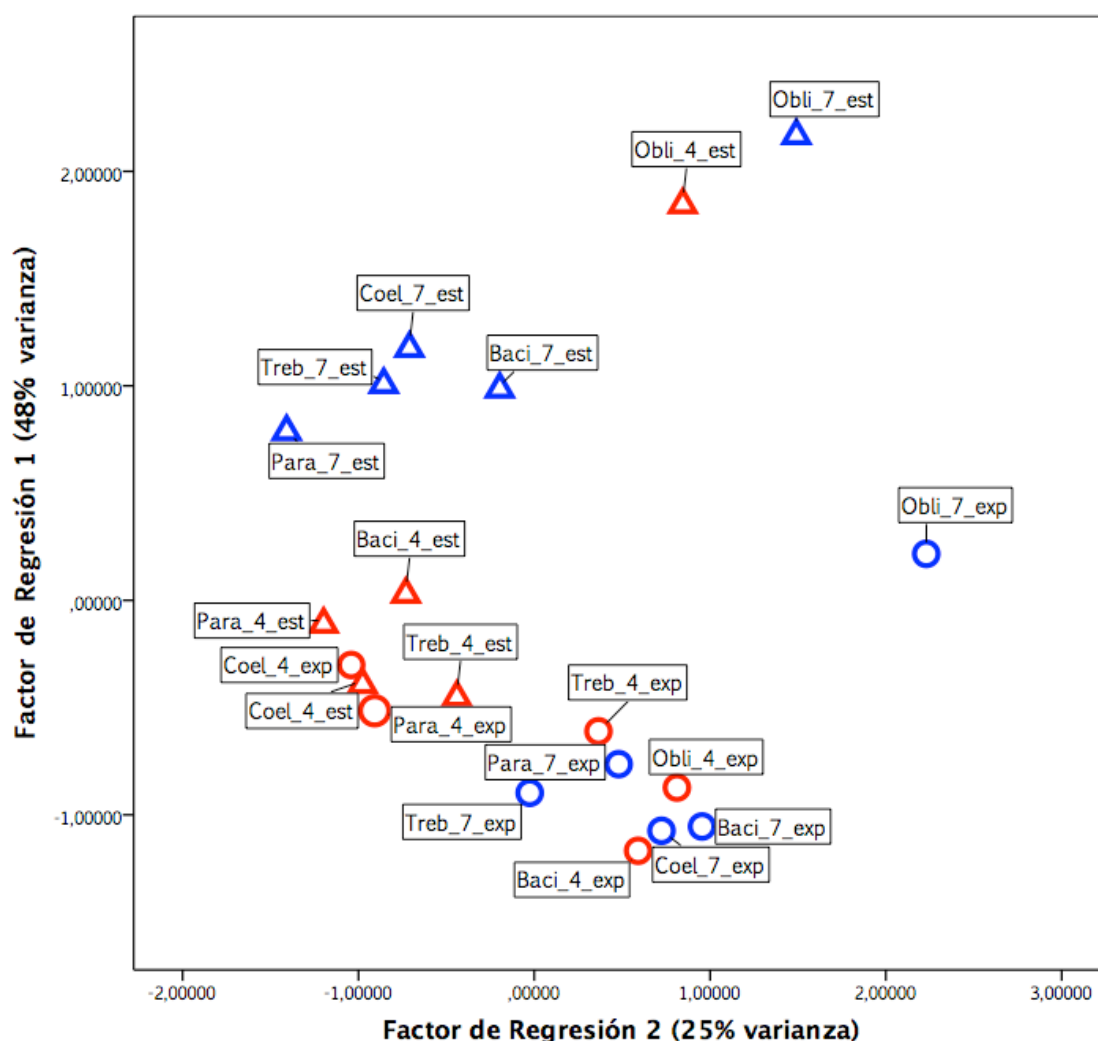
Estas interacciones podrían ser más o menos eficaces dependiendo no sólo de la relación superficie/volumen de las nanopartículas, sino también de la composición de la corona. Se han identificado determinados tipos de biomoléculas en los caldos de cultivos o en los extractos utilizados para la síntesis biológica de nanopartículas tales como proteínas, polifenoles, terpenoides, etc. (Barwal y col., 2011), pero no se ha estudiado exhaustivamente el papel que juegan en la formación de las nanopartículas o si se incorporan formando parte de la corona de estas. En general comparar los resultados obtenidos sobre la actividad antibacteriana con otros datos presentes en la literatura es difícil por la diferencia en los protocolos y en las bacterias testigo y en la medida de la efectividad de la acción antibacteriana. No todos los estudios sobre la producción de nanopartículas de plata han testado su actividad antibacteriana, y de los que lo han hecho no todos emplean una medida comparable con el índice utilizado en este estudio. En los trabajos que han utilizado el índice IC_{50} se obtienen unos valores dentro de un rango entre 0,07 a 3 mgL⁻¹ (Javani y col., 2015; da Silva Ferreira y col., 2017; Rao y Boominathan, 2015) aunque como se ha indicado anteriormente, la utilización de diferentes cepas testigo hace difícil la comparación de estos valores entre ellos y con los medidos para las NPs producidas en este trabajo a excepción del trabajo de Javani y col., (2015) que ha sido realizado en nuestro laboratorio, y en el que se han utilizado las mismas cepas de las especies bacterianas testigo. En nuestro estudio, de las nanopartículas más activas frente a *E. coli* y a *K. pneumoniae* se obtuvieron unos IC_{50} respectivamente de 1,9 mgL⁻¹ (Para_4_exp) y de 1,42 mgL⁻¹ (Coel_4_exp), mientras en el trabajo de Javani los valores fueron menores, de 0,9 mgL⁻¹ (*E. coli*) y de 0,7 mgL⁻¹ (*K. pneumoniae*) (Javani y col., 2015) indicando que las NPs obtenidas en este trabajo utilizando caldo de cultivo bacteriano, fueron más activas que las obtenidas con caldo de cultivo de microalgas.

4.2.2.2.4 Análisis estadístico

Para intentar detectar si existe alguna relación entre las condiciones de crecimiento de las microalgas con las características de su cinética de formación y las propiedades fisicoquímicas más relevantes de estas y la actividad antimicrobiana, se llevó a cabo un PCA integrando los datos procedentes del análisis relativos a la cinética de producción de las nanopartículas (tiempo máx λ), a su tamaño (tamaño medio, PDI y agregación observada al TEM) y a la actividad antibacteriana estudiada (Fig. 61).

El análisis de los componentes principales muestra la agrupación de las muestras según los valores obtenidos en los dos factores de regresión extraídos, que representan en conjunto el 73% de la varianza total (las tablas de la varianza total explicada, la matriz de componentes y el gráfico de sedimentación se encuentran en el anexo II, Tab. 1 y 2 y Fig. 13.). Se observa que existe una segregación en el caso de las muestras procedente de los aislados cultivados a pH7 y a pH4 y, además, entre las muestras de pH7 existe una separación en el conjunto perteneciente a las muestras de la fase exponencial (círculos) y las de fase estacionaria (triángulos). Estas diferencias se podrían explicar primero por el efecto dependiente de pH sobre los agentes reductores presentes en el medio. Existen estudios en los que se demuestra que el pH afecta a la síntesis extracelular de las nanopartículas de plata en solución acuosa.

Figura 61. PCA de los resultados obtenidos relativos a la cinética de producción de AgNPs, al análisis del tamaño y a la actividad antibacteriana estudiada. En rojo las muestras a pH4, en azul las muestras a pH7 y los triángulos representan las muestras en fase estacionaria mientras los círculos corresponden a las muestras de fase exponencial.



A pHs más bajos, el poder reductor de varios grupos funcionales es más reducido por la alta concentración de H^+ en la solución acuosa. Pero con un aumento del pH el poder reductor aumenta, condición que promueve la estabilidad de las nanopartículas y previene su aglomeración (Mata y col. 2010; Parial y col. 2012; Parial y Pal 2015). Las diferencias identificadas en las muestras de pH7 entre las dos fases de crecimiento, se podrían deber a los mayores efectos dependientes de pH en los cultivos más crecidos (fase estacionaria) y, como consecuencia, la diferente cantidad e incluso diferente tipología tanto de agentes reductores como de estabilizantes. En esa fase puede que i) el nivel del agente reductor alcance el nivel umbral para que las reacciones sean observables y/o medibles o ii) que el aumento de los diferentes metabolitos excretados al caldo, junto con el material intracelular de las células rotas, den lugar a otros compuestos que actúen como agentes reductores amplificándose la reacción de reducción de la plata en el caldo.

4.3 CONSIDERACIONES GENERALES

El lugar de estudio de este trabajo ha sido la región intermareal del río Tinto localizada a la altura de la población de San Juan del Puerto (Huelva) situado a unos 30 km de la desembocadura del río. Sufre la influencia diaria de las mareas que llevan a cambios temporales de las características físico-químicas del agua. Junto con esta variación, se ha mostrado en este estudio, la existencia de cambios en la comunidad microbiana de este ecosistema siendo, en las muestras de marea baja, más parecida a la de las aguas ácidas del río y en las de marea alta, similar a la encontrada en el punto de muestreo control en La Rábida, con gran influencia de la comunidad microbiana del océano.

Entre los microorganismos que se han encontrado en el ecosistema estudiado, se encuentran microalgas acidotolerantes de las cuales se han aislado cinco clorofitas (taxón que comprende la mayoría de las especies descritas en los estudios de diversidad en el río Tinto por otros autores) y una rodofita.

Dada la importancia de las microalgas desde el punto de vista biotecnológico, según se describe en la literatura, se ha llevado a cabo un estudio de algunas de sus propiedades con posibles aplicaciones. En concreto se ha estudiado su tolerancia a diferentes metales y la capacidad de los caldos obtenidos tras su cultivo para producir NPs con actividad antimicrobiana, caracterizándose las mismas tanto en cuanto a su cinética de formación y estabilidad como a sus características fisicoquímicas tales como tamaño, cristalinidad, dispersión, etc.

El trabajo realizado abre nuevas líneas de estudio que podrán continuarse en el futuro y en el que podrá testarse la capacidad biorremediadora de estos microorganismos con metales pesados, así como optimizar la producción de nanopartículas para el diseño de una metodología eficaz para la obtención de estos materiales con elevada actividad antimicrobiana.

Adicionalmente se podrán abordar estudios de otras posibles capacidades biotecnológicas de los aislados tales como la producción y aplicaciones de exopolímeros, utilización en la producción de biocombustibles, etc.

5 CONCLUSIONES

1. La zona de San Juan del Puerto es la que muestra mayor influencia mareal, tanto en las variables ambientales como las geoquímicas, por lo que ha sido seleccionada para el estudio de influencia de las variables físico-químicas en la diversidad microbiana de la zona más extrema de la cuenca del río Tinto, que cambia de pH dos veces al día. El análisis estadístico muestra un adecuado nivel de segregación de las muestras tomadas en alta y baja marea en San Juan del Puerto en distintas estaciones climatológicas.
2. Los estudios de biodiversidad muestran la existencia de microorganismos acidófilos en las muestras de marea baja pertenecientes a los géneros *Acidocella*, *Acidobacterium*, *Acidophilium* y *Ferromicrobium*, algunos de ellos identificados en muestras de marea alta, todos ellos reportados previamente en la parte de la cuenca del Tinto no sujeta a influencia mareal. No se han detectado clones de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, lo que indican su extrema sensibilidad al cambio de condiciones ambientales en esta parte de la cuenca del Tinto.
3. Se han detectado clones de origen oceánico capaces de resistir las condiciones extremas de pH y concentración de metales en las muestras de baja marea pertenecientes a los géneros: *Arcobacter*, *Methylophaga*, *Mesorhizobium*, *Marinobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*. Así mismo se han detectado clones de géneros que no resisten dichas condiciones: *Marinomonas*, *Limnobacter* y *Rhodobacter*.
4. El análisis de correspondencia entre las variables ambientales y la diversidad biológica muestra una estrecha correlación entre los microorganismos acidófilos, las muestras de baja marea que los contienen y la presencia de metales pesados. Las muestras de marea alta a pesar de ser más dispersas muestran un elevado grado de correlación con propiedades ambientales (conductividad, salinidad y pH) y concentración de Cl^- , lo que indica su clara influencia oceánica.
5. A partir de los muestreos efectuados en la zona de influencia mareal de San Juan del Puerto se aislaron seis cultivos de microalgas acidotolerantes que se cultivaron a pH4 y a pH7. Su afiliación filogenética se realizó por análisis del 18S rRNA. El aislado SJP_EPB_1 se ha adscrito al género *Parachlorella* sp. El cultivo SJP_EAP_2, en proceso de caracterización, pertenece a la familia de las Trebouxiophyceae. Los aislados de la familia de las Scenedesmaceae, el SJP_EBO_3 y SJP_EBO_4 se han adscrito a la especie *Tetradismus obliquus* y al género *Coelastrella* sp. respectivamente. A la especie *Stichococcus bacillaris* corresponde la identificación del aislado SJP_EBI_5 y al género *Porphyridium* sp. el SJP_EAI_6.
6. Del análisis de la tolerancia de los aislados a diferentes concentraciones de cadmio, cobre, hierro y plomo a pHs 4 y 7 se puede deducir que los aislados con mejor tolerancia a Cd^{2+} fueron *Trebouxiophyceae* sp. y *Porphyridium* sp., a

Cu^{2+} *Coelastrella* sp. y *Porphyridium* sp., a Fe^{2+} , *S. bacillaris* y a Pb^{2+} *Trebouxiophyceae* sp. En todos los casos en cultivos a pH7.

7. En la mayoría de los cultivos en presencia de metales se observó la producción de un mucílago extracelular no presente en los controles, detectándose variaciones morfométricas en los cultivos de todos los aislados con la excepción de *Stichococcus bacillaris*, especialmente en presencia de Cu^{2+} a pH7 y a pH4.
8. Mediante microscopía óptica se observó la adsorción a la superficie celular o al mucilago de los metales Cd^{2+} y Pb^{2+} en los cultivos de *Parachlorella* sp. y *Coelastrella* sp realizados a pH7 y de Fe en los cultivos de *Parachlorella* sp. y *T. obliquus* a pH7, así como para los cultivos de *Coelastrella* sp. a los pHs 4 y 7.
9. Las clorofitas aisladas en este trabajo cultivadas tanto a pH4 como a pH 7 mostraron la capacidad de producir extracelularmente nanopartículas de plata. La forma y tamaño de las nanopartículas, así como su actividad antibacteriana, está relacionada con la fase de crecimiento del cultivo, siendo las de fase estacionaria las que presentan mayor estabilidad en todos los casos. La forma de las nanopartículas fue prevalentemente esférica con tamaños medio entre 8 y 18 nm de diámetro y un índice de dispersión moderado.
10. La actividad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas a partir de las microalgas aisladas fue mayor frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC6538P (Gram positiva) que a *Escherichia coli* ATCC10536 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 (Gram negativas) siendo las nanopartículas producidas a partir de los aislados *Parachlorella* sp. y *Trebouxiophyceae* sp. las que mostraron mayor actividad frente a las tres bacterias utilizadas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Hattori H, Hirano M** (2007) Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry* **100**: 656–661
- Abe K, Takizawa H, Kimura S, Hirano M** (2004) Characteristics of chlorophyll formation of the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* and its application for environmental biomonitoring. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98**: 34–39
- Acuña-González J, Vargas-Zamora JA, Gómez-Ramírez E, García-Céspedes J** (2004) Hidrocarburos de petróleo, disueltos and dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **52**: 43–50
- Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S** (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* **4**: 3974–3983
- Aguilera A** (2013) Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. *Life* **3**: 363–374
- Aguilera A, Amils R** (2005) Tolerance to cadmium in sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic Toxicology* **75**: 316–329
- Aguilera A, Gómez F, Lospitao E, Amils R** (2006a) A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 593–605
- Aguilera A, Manrubia SC, Gomez F, Rodríguez N, Amils R** (2006b) Eukaryotic Community Distribution and Its Relationship to Water Physicochemical Parameters in an Extreme Acidic Environment, Río Tinto (Southwestern Spain). *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5325–5330
- Aguilera A, Souza-Egipsy V, Gómez F, Amils R** (2007a) Development and Structure of Eukaryotic Biofilms in an Extreme Acidic Environment, Río Tinto (SW, Spain). *Microb Ecol* **53**: 294–305
- Aguilera A, Zettler E, Gómez F, Amaral-Zettler L, Rodríguez N, Amils R** (2007b) Distribution and seasonal variability in the benthic eukaryotic community of Río Tinto (SW, Spain), an acidic, high metal extreme environment. *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 531–546
- Alam MA, Wan C, Zhao X-Q, Chen L-J, Chang J-S, Bai F-W** (2015) Enhanced removal of Zn²⁺ or Cd²⁺ by the flocculating *Chlorella vulgaris* JSC-7. *Journal of Hazardous Materials* **289**: 38–45
- Alani F, Moo-Young M, Anderson W** (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 1081–1086
- Alexander JW** (2009) History of the medical use of silver. *Surgical infections* **10**: 289–292
- Allen MM** (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae. *Journal of general microbiology* **51**: 199–202
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403–410
- Amaral Zettler LA** (2012) Eukaryotic diversity at pH extremes. *Frontiers in microbiology* **3**: 1–17

- Amaral Zettler LA, Gómez F, Zettler E, Keenan BG, Amils R, Sogin ML** (2002) Microbiology: Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* **417**: 137–137
- Amaral Zettler LA, Messerli MA, Laatsch AD, Smith PJ, Sogin ML** (2003) From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto. *The Biological Bulletin* **204**: 205–209
- Amaral Zettler LA, Zettler ER, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R** (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *The ISME journal* **5**: 42
- Amils R, Gonzalez-Toril E, Fernández-Remolar D, Gomez F, Rodriguez N, Durán C** (2002) Interaction of the sulfur and iron cycles in the Tinto River ecosystem. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1**: 299–309
- Andersen RA** (2005) Algal culturing techniques. Phycological Society of America, ELSEVIER Academic Press.
- Anderson DM, Morel FM** (1978) Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnology and Oceanography* **23**: 283–295
- Arunakumara K, Zhang X** (2008) Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of ocean university of china* **7**: 60–64
- Ashraf S, Chatha MA, Ejaz W, Janjua HA, Hussain I** (2014) Lysozyme-coated silver nanoparticles for differentiating bacterial strains on the basis of antibacterial activity. *Nanoscale research letters* **9**: 565
- ATSDR** (2007) Toxicological profile for lead. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1-582
- ATSDR** (2012) Toxicological profile for lead. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1-487
- Baker BJ, Tyson GW, Goosherst L, Banfield JF** (2009) Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2192–2199
- Barwal I, Ranjan P, Kateriya S, Yadav S** (2011) Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanobiotechnol* **9**: 56-68
- Baweja M, Nain L, Kawarabayasi AND, Shukla P** (2016) Current technological improvements in enzymes toward their biotechnological applications. *Frontiers in microbiology* **7**:965.
- Beeler E, Singh OV** (2016) Extremophiles as sources of inorganic bio-nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**: 156 DOI 10.1007/s11274-016-2111-7
- Berthold D, Puranik P, Gantar M, Gantar M** (2015) Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports* **5**: 112–119
- Bonferroni CE** (1936) Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita, **8**: 3-62.
- Bossuyt BTA, Janssen CR** (2004) Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology* **68**: 61–74

- Bowler C** (2012) Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae. 1–13 DOI 10.3389/fmicb.2012.00043
- Braungardt CB, Achterberg EP, Elbaz-Poulichet F, Morley NH** (2003) Metal geochemistry in a mine-polluted estuarine system in Spain. *Applied Geochemistry* **18**: 1757–1771
- Brinza L, Dring MJ, Gavrilescu M** (2007) Marine micro and macro algal species as biosorbents for heavy metals. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)* **6**: 237–251
- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L** (2010) Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* **49**: 9–21
- Campelo JM, Luna D, Luque R, Marinas JM, Romero AA** (2009) Sustainable preparation of supported metal nanoparticles and their applications in catalysis. *ChemSusChem* **2**: 18–45
- Cannio R, Di Prizito N, Rossi M, Morana A** (2004) A xylan-degrading strain of *Sulfolobus solfataricus*: isolation and characterization of the xylanase activity. *Extremophiles* **8**: 117–124
- Cantrell SA, Dianese JC, Fell J, Gunde-Cimerman N, Zalar P** (2011) Unusual fungal niches. *Mycologia* **103**: 1161–1174
- Cao D-J, Shi X-D, Li H, Xie P-P, Zhang H-M, Deng J-W, Liang AND-G** (2015) Effects of lead on tolerance, bioaccumulation, and antioxidative defense system of green algae, *Cladophora*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **112**: 231–237
- Carbajosa S, Malki M, Caillard R, Lopez MF, Palomares FJ, Martín-Gago JA, Rodríguez N, Amils R, Fernández VM, De Lacey AL** (2010) Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 877–880
- Carfagna S, Lanza N, Salbitani G, Basile A, Sorbo S, Vona V** (2013) Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus* **2**: 147–154
- Carmona-Galindo V, Carmona T V** (2013) La diversidad de los análisis de diversidad. *Bioma*, **14**: 20–28.
- Chen B, You W, Huang J, Yu Y, Chen W** (2010) Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 833–840
- Chen CY, Folt CL** (2000) Bioaccumulation and Diminution of Arsenic and Lead in a Freshwater Food Web. *Environ Sci Technol* **34**: 3878–3884
- Cheng J, Qiu H, Chang Z, Jiang Z, Yin W** (2016) The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *SpringerPlus* **5**: 1290 DOI 10.1186/s40064-016-2963-1
- Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, Lee D-J, Chang J-S** (2017) Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology* **229**: 53–62
- Choi Y-E, Yun YS, Park JM** (2002) Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnology progress* **18**: 1170–1175
- Corkrey R, McMeekin TA, Bowman JP, Olley J, Ratkowsky D, Ross T** (2017) The maximum growth rate of life on Earth. *International Journal of Astrobiology*

- Crump, Byron C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., & Hobbie, J. E.** (2004) Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and environmental microbiology* **70**: 1494-1505.
- da Silva Ferreira V, ConzFerreira ME, Lima LMTR, Frasés S, de Souza W, Sant'Anna C** (2017) Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Enzyme y Microbial Technology* **97**: 114-121
- Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB** (2015) Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs* **13**: 1925-1965
- Davis TA, Volesky B, Mucci A** (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* **37**: 4311-4330
- Dąbrowski A, Hubicki Z, Podkościelny P, Robens E** (2004) Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere* **56**: 91-106
- De Filippis LF, Ziegler H** (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *Journal of Plant Physiology* **142**: 167-172
- de Sanctis O** (2013) Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis. *Journal of Nanoparticles* 2013 DOI 10.1155/2013/524150
- Debelius B, Forja JM, DelValls Á, Lubián LM** (2009) Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 1503-1513
- Demain AL** (2000) Microbial biotechnology. *Trends in biotechnology* **18**: 26-31
- Demain AL, Adrio JL** (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology* **38**: 41-55
- Deng L, Zhang Y, Qin J, Wang X, Zhu X** (2009) Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by nonliving green algae *Cladophora albida*. *Minerals Engineering* **22**: 372-377
- Dewan SS, Setia KA** (2014) Global markets for enzymes in industrial applications. Wellesley, MA: BCC Reseaerch
- Dhakar K, Pandey A** (2016) Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 2499-2510
- Ding Q, Ding F, Qian T, Zhao D, Wang L** (2015) Reductive immobilization of rhenium in soil and groundwater using pyrite nanoparticles. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**: 409 DOI 10.1007/s11270-015-2588-y
- Doshi H, Ray A, Kothari IL, Gami B** (2006) Spectroscopic and scanning electron microscopy studies of bioaccumulation of pollutants by algae. *Current microbiology* **53**: 148-157
- Dönmez GÇ, Aksu Z, Öztürk A, Kutsal T** (1999) A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process biochemistry* **34**: 885-892
- Dvir I, Chayoth R, Sod-Moriah U, Shany S, Nyska A, Stark AH, Madar Z, Arad SM** (2000) Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal

- morphology and reduce serum cholesterol in rats. *British journal of Nutrition* **84**: 469–476
- Dvir I, Stark AH, Chayoth R, Madar Z, Arad SM** (2009) Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats. *Nutrients* **1**: 156–167
- Eberhard H, Christina B, Lothar K** (2013) A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Fottea* **13**: 149–164
- El-Deeb B, Mostafa NY, Altalhi A, Gherbawy Y** (2013) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by bacteria *Alcaligenes faecalis* with highly efficient anti-microbial property. *Int J Chem Eng* **30**: 1137–1144
- Filippis LF, Pallaghy CK** (1994) Heavy metals: sources and biological effects. *Advances in limnology* In: Rai, L.C., Gaur, J.P. and Soeder, C.J. Eds., *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution*, E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart, 31–77
- Fisher RA** (1925) *Statistical methods for research workers. Breakthroughs in Statistics*. Springer New York, 66–70.
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ, Lim RP** (2000) pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* **48**: 275–289
- Freire-Nordi CS, Vieira AAH, Nascimento OR** (2005) The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process biochemistry* **40**: 2215–2224
- García-Moyano A, González-Toril E, Aguilera A, Amils R** (2012) Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Rio Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiology Ecology* **81**: 303–314
- Gasljevic K, Hall KA, Oakes S, Chapman DJ, Matthys EF** (2009) Increased production of extracellular polysaccharide by *Porphyridium cruentum* immobilized in foam sheets. *Eng Life Sci* **9**: 479–489
- Ghaemi M, Gholamipour S** (2017) Controllable Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Sargassum Angostifolium*. *IJCCE* **36**: 1–10
- Gharieb MM, Gadd GM** (2004) Role of glutathione in detoxification of metal (loid) s by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* **17**: 183–188
- Gissi F, Adams MS, King CK, Jolley DF** (2015) A robust bioassay to assess the toxicity of metals to the antarctic marine microalga *Phaeocystis antarctica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **34**: 1578–1587
- Goharshadi EK, Moghaddam MB** (2015) Adsorption of hexavalent chromium ions from aqueous solution by graphene nanosheets: kinetic and thermodynamic studies. *International Journal of Environmental Science and Technology* **12**: 2153–2160
- Gomes J, Steiner W** (2004) The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology* **42**: 223–235
- Gonzalez-Toril E, Gomez F, Rodríguez N, Fernández-Remolar D, Zuluaga J, Marín I, Amils R** (2003a) Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy. *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development* **71**: 301–309
- Gonzalez-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, Amils R** (2003b) Microbial

- ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4853–4865
- Goretti, E., Pallottini, M., Ricciarini, M. I., Selvaggi, R., & Cappelletti, D.** (2016). Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of the total environment*, **559**: 339-346
- Goodfellow M, Stackebrandt E** (1991) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. **5**: 225-236
- Govindaraju K, Kiruthiga V, Kumar VG, Singaravelu G** (2009) Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum wightii grevilli* and their antibacterial effects. *J Nanosci Nanotech* **9**: 5497–5501
- Guillard RRL, Hargraves PE** (1993) *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **32**: 234–236
- Hamed SM, Selim S, Klöck G, AbdElgawad H** (2017) Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **144**: 19–25
- Hannon M, Gimpel J, Tran M, Rasala B, Mayfield S** (2010) Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* **1**: 763–784
- He J, Chen JP** (2014) A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology* **160**: 67–78
- Henglein A** (1993) Physicochemical properties of small metal particles in solution: “microelectrode” reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *The Journal of Physical Chemistry* **97**: 5457–5471
- Holzinger A, Pichrtov M** (2016) Abiotic Stress Tolerance of Charophyte Green Algae: New Challenges for Omics Techniques. *Front Plant Sci* **7**: 273–17
- Hu C-W, Chuang L-T, Yu P-C, Chen C-NN** (2013) Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chemistry* **138**: 2071–2078
- Huang J, Chen B-L, You W-L** (2005) Studies on separation of extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum* and its anti-HBV activity in vitro. *Chinese Journal of Marine Drugs* **24**: 18-21
- Ibrahim WM** (2011) Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. *Journal of Hazardous Materials* **192**: 1827–1835
- Indhumathi P, PS SS, Shoba US** (2014) A Method for production and characterization of biodiesel from green micro algae. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* **6**: 111–122
- Ishaq AG, Matias-Peralta HM, Basri H** (2016) Bioactive Compounds from Green Microalga-*Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **39**: 1-15
- Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, Kärinen A, Titma T, Heinlaan M, and col** (2014) Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. *PLoS ONE* **9**: e102108–14

- Jackson BR, Noble C, Lavesa-Curto M, Bond PL, Bowater RP** (2007) Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles* **11**: 315–327
- Jaenicke R** (1981) Enzymes under extremes of physical conditions. *Annual review of biophysics and bioengineering* **10**: 1–67
- Janssen CR, Heijerick DG** (2003) Algal Toxicity Tests for Environmental Risk Assessments of Metals. *In* *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, New York, NY, pp 23–52
- Javani S, Marín I, Amils R, Abad JP** (2015) Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **483**: 60–69
- Jebakumar TN, Sethuraman MG** (2013) Electrocatalytic reduction of benzyl chloride by green synthesized silver nanoparticles using pod extract of *Acacia nilotica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **1**: 1326–1332
- Jena J, Pradhan N, Dash BP, Sukla LB, Panda PK** (2013) Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using microalga *Chlorococcum humicola* and its antibacterial activity. *Int J Nanomater Biostruct* **3**: 1–8
- Johnson HL, Stauber JL, Adams MS, Jolley DF** (2007) Copper and zinc tolerance of two tropical microalgae after copper acclimation. *Environmental toxicology* **22**: 234–244
- Kagalou I, Beza P, Perdikaris C, Petridis D** (2002) Effects of copper and lead on microalgae growth. *Fresenius Environmental Journal* **11**: 233–236
- Kaplan D, Christiaen D, Arad SM** (1987) Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2953–2956
- Kennish MJ** (2002) Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental conservation* **29**: 78–107
- Khalid M, Khalid N, Ahmed I, Hanif R, Ismail M, Janjua HA** (2017) Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities. **29**: 1851–1863
- Khan SS, Mukherjee A, Chandrasekaran N** (2012) Adsorptive removal of silver nanoparticles (SNPs) from aqueous solution by *Aeromonas punctata* and its adsorption isotherm and kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **92**: 156–160
- Kharissova OV, Dias HR, Kharisov BI, Pérez BO, Pérez VMJ** (2013) The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology* **31**: 240–248
- Kiran B, Kaushik A** (2008) Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides. *Biochemical Engineering Journal* **38**: 47–54
- Kjerfve B** (1990) Manual for investigation of hydrological processes in mangrove ecosystems. Baruch Institute for Marine Biology and Coastal Research. Department of Geological Sciences and Marine Science Program Department of Geological Sciences, University of South Carolina Columbia, SC 29208, U.S.A..
- Klasen HJ** (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**: 131–138

- Kleinübing SJ, Da Silva FGC, Bertagnolli C, Da Silva MGC** (2011) Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Sargassum filipendula*. *Chemical Engineering Transactions* **24**: 1201–1206
- Knauer K, Ahner B, Xue HB, Sigg L** (1998) Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 2444–2452
- Konings WN, Albers S-V, Koning S, Driessen AJ** (2002) The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 61–72
- Krienitz L, Bock C** (2012) Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* **698**: 295–326
- Krienitz L, Hegewald EH, Hepperle D, Huss VAR, Rohr T, Wolf M** (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* **43**: 529–542
- Kumar KS, Dahms H-U, Won E-J, Lee J-S, Shin K-H** (2015) Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **113**: 329–352
- La Fontaine S, Quinn JM, Nakamoto SS, Page MD, Gohre V, Moseley JL, Kropat J, Merchant S** (2002) Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **1**: 736–757
- Lapage SP, Shelton JE, Mitchell TG, Mackenzie AR** (1970) Chapter II Culture Collections and the Preservation of Bacteria. In JRN Ribbons, D W, eds, *Methods in Microbiology*. Academic Press, pp 135–228
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, and col** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**: 2947–2948
- Le AT, Le TT, Nguyen VQ, Tran HH, Dang DA, Tran QH, Vu DL** (2012) Powerful colloidal silver nanoparticles for the prevention of gastrointestinal bacterial infections. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* **3**: 1–10
- Lebreton B, Richard P, Galois R, Radenac G, Pfléger C, Guillou G, Mornet F, Blanchard GF** (2011) Trophic importance of diatoms in an intertidal *Zostera noltii* seagrass bed: Evidence from stable isotope and fatty acid analyses. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **92**: 140–153
- Leliaert F, Smith DR, Moreau H, Herron MD, Verbruggen H, Delwiche CF, De Clerck O** (2012) Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 1–46
- Lemoine Y, Schoefs B** (2010) Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res* **106**: 155–177
- Lennox ES** (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190–206
- Lepš J, Šmilauer P** (2003) *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge University Press, Cambridge
- Lesmana SO, Febriana N, Soetaredjo FE, Sunarso J, Ismadji S** (2009) Studies on potential

- applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochemical Engineering Journal* **44**: 19–41
- Li X, Příbyl P, Bišová K, Kawano S, Cepák V, Zachleder V, Čížková M, Brányiková I, Vítová M** (2013) The microalga *Parachlorella kessleri*—A novel highly efficient lipid producer. *Biotechnol Bioeng* **110**: 97–107
- Liang S, Kang Y, Zeng L, Qin Y, Wang L, Zhang Q, Luo J** (2017) How *Chlorella sorokiniana* and its High Tolerance to Pb Might be a Potential Pb Biosorbent. *Pol J Environ Stud* **26**: 1139–1146
- Liu L, Pohnert G, Wei D** (2016) Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. *Marine Drugs* **14**: 191–209
- Liu M, Chen W** (2013) Graphene nanosheets-supported Ag nanoparticles for ultrasensitive detection of TNT by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **46**: 68–73
- Lodeiro P, Cordero B, Barriada JL, Herrero R, De Vicente MS** (2005) Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae. *Bioresource Technology* **96**: 1796–1803
- López-Archilla AI, González AE, Terrón MC, Amils R** (2004) Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Canadian journal of microbiology* **50**: 923–934
- López-Archilla AI, Marin I, Amils R** (1993) Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Rio Tinto, Spain. *Geomicrobiology Journal* **11**: 223–233
- López-Archilla AI, Marin I, Amils R** (2001) Microbial Community Composition and Ecology of an Acidic Aquatic Environment: The Tinto River, Spain. *Microb Ecol* **41**: 20–35
- Luna GM, Dell'Anno A, Pietrangeli B, Danovaro R** (2010) Molecular approaches for the assessment of fecal bacterial contamination in marine harbor sediments. *Journal of Biotechnology* **150**: 221–222
- Lyra L, Perry RH, Perry EK, Ince PG, Jenner A, Jenner P, Halliwell B** (1998) Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of neurochemistry* **71**: 302–312
- MacElroy RD** (1974) Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* **6**: 74–75
- Malki M, De Lacey AL, Rodríguez N, Amils R, Fernández VM** (2008) Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4472–4476
- Mamonova IA, Babushkina IV, Norkin IA, Gladkova EV, Matasov MD, Puchin'yan DM** (2015) Biological activity of metal nanoparticles and their oxides and their effect on bacterial cells. *Nanotechnologies in Russia* **10**: 128–134
- Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P** (2006) The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 485–492
- Mangold S, Rao Jonna V, Dopson M** (2013) Response of *Acidithiobacillus caldus* toward suboptimal pH conditions. *Extremophiles* **17**: 689–696
- Manivel P, Ilanchelian M** (2017) Selective and Sensitive Colorimetric Detection of Hg²⁺ at Wide

- pH Range Using Green Synthesized Silver Nanoparticles as Probe. *Journal of Cluster Science* **28**: 1145–1162
- Marambio-Jones C, Hoek EMV** (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* **12**: 1531–1551
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS** (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**: 217–232
- Matsunaga T, Takeyama H, Nakao T, Yamazawa A** (1999) Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology* **70**: 33–38
- Maznah WW, Al-Fawwaz AT, Surif M** (2012) Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences* **24**: 1386–1393
- McNeil SE** (2005) Nanotechnology for the biologist. *Journal of leukocyte biology* **78**: 585–594.
- Menzyanova NG, Goltvyansky AV, Kuznetsova YA, Sysenko EI** (2009) Season variability of iron effects on periodic culture of microalgae *Dunaliella viridis* Teod. *Front Biol China* **4**: 328–336
- Merin DD, Prakash S, Bhimba BV** (2010) Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro algae. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **3**: 797–799
- Merkus HG** (2009) Particle Size Measurements. *Springer Science & Business Media* **17**:1–535
- Miao AJ, Quigg A, Schwehr K, Xu C, Santschi P** (2007) Engineered silver nanoparticles (ESNs) in coastal marine environments: bioavailability and toxic effects to the phytoplankton *Thalassiosira weissflogii*. 2nd International conference on the environmental effects of nanoparticles and nanomaterials, 24th 25th September, London UK
- Miaze K, Iwanek W, Remacle C, Richel A, Goffin D** (2015) Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *IJMS* **16**: 23929–23969
- Michaux C, Pouyez J, Mayard A, Vandurm P, Housen I, Wouters J** (2010) Structural insights into the acidophilic pH adaptation of a novel endo-1, 4- β -xylanase from *Scytalidium acidophilum*. *Biochimie* **92**: 1407–1415
- Mishra D, Rhee YH** (2014) Microbial leaching of metals from solid industrial wastes. *Journal of Microbiology* **52**: 1–7
- Monteiro MJ, Cunningham MF** (2012) Polymer nanoparticles via living radical polymerization in aqueous dispersions: design and applications. *Macromolecules* **45**: 4939–4957
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ** (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**: 2346–2353
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G** (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell & Environment* **24**: 141–153
- Morrison D** (2001) The NASA astrobiology program. *Astrobiology* **1**: 3–13
- Nalewajko C, Olaveson MM** (1998) Ecophysiological considerations in microalgal toxicity tests.

- Microscale testing in aquatic toxicity: advances, technical and practice CRC Press Boca Raton, 289-309
- Needleman H** (2004) Lead poisoning. *Annu Rev Med* **55**: 209-222
- Nieto JM, Sarmiento AM, Canovas CR, Olías M, Ayora C** (2013) Acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt: 1. Hydrochemical characteristics and pollutant load of the Tinto and Odiel rivers. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**: 7509-7519
- Nishikawa K, Yamakoshi Y, Uemura I, Tominaga N** (2003) Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* **44**: 253-259
- Oboh G, Raddatz H, Henle T** (2009) Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of Jute (*Corchorus olitorius*) leaf. *International journal of food sciences and nutrition* **60**: 124-134
- Okamoto OK, Colepicolo P** (1998) Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **119**: 67-73
- Ortega FG, Fernández-Baldo MA, Fernández JG, Serrano MJ, Sanz MI, Diaz-Mochón JJ, Lorente JA, Raba J** (2015) Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. *International Journal of Nanomedicine* **10**: 2021
- Ota S, Oshima K, Yamazaki T, Kim S, Yu Z, Yoshihara M, Takeda K, Takeshita T, Hirata A, Bišová K** (2016) Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure. *Biotechnology for Biofuels* **9**: 13 DOI 10.1186/s13068-016-0424-2
- Palacios C, Zettler E, Amils R, Amaral-Zettler L** (2008) Contrasting Microbial Community Assembly Hypotheses: A Reconciling Tale from the Río Tinto. *PLoS ONE* **3**: e3853 doi:10.1371/journal.pone.0003853
- Parial D, Patra HK, Roychoudhury P, Dasgupta AK, Pal R** (2012) Gold nanorod production by cyanobacteria—a green chemistry approach. *Journal of Applied Phycology* **24**: 55-60
- Parial D, Pal R** (2015) Biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by green alga *Rhizoclonium* and associated biochemical changes. *Journal of Applied Phycology* **27**: 975-984
- Pascal N, Dome A-J** (1994) Inhibition of fatty acid desaturation in sycamore cells deprived of iron. *FEBS letters* **353**: 95-98
- Paz Y, Shimon E, Weiss M, Pick U** (2007) Effects of iron deficiency on iron binding and internalization into acidic vacuoles in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* **144**: 1407-1415
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO** (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **64**: 1-10
- Pérez-Rama, M., Alonso, J. A., López, C. H., & Vaamonde, E. T.** (2002). Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, **84**: 265-270
- Philip, D., Unni, C., Aromal, S. A., & Vidhu, V. K.** (2011). *Murraya koenigii* leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **78**(2), 899-904.

- Pollio A, Aliotta G, Pinto G, Paterno M, Bevilacqua A** (1997) Ecophysiological characters and biochemical composition of *Stichococcus bacillaris* Naegeli strains from low pH environments. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **84**: 129-143
- Price NM, Morel FM** (1994) Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. In *Archiv für Hydrobiologie, Advances in Limnology*, Stuttgart **42**: 79-97
- Promega Corporation** (2015) pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042. 1-29
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO** (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: 590-596
- Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E** (2013) Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron* **54**: 1-27
- Rajamanickam U, Mysamy P, Viswanathan S, Muthusamy P** (2012) Biosynthesis of zinc nanoparticles using actinomycetes for antibacterial food packaging. **39**: 195-199
- Rajvanshi S, Sharma MP** (2012) Micro algae: a potential source of biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems* **2**: 49-59
- Rampelotto P** (2013) Extremophiles and Extreme Environments. *Life* **3**: 482-485
- Rao BV, Boominathan M** (2015) Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Seaweeds. *American Journal of Advanced Drug Delivery* **5**: 296-307
- Raposo MF de J, de Moraes RMSC, Bernardo de Moraes AMM** (2013) Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs* **11**: 233-252
- Raposo MF, de Moraes AMB, de Moraes RMSC** (2015) Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine Drugs* **13**: 2967-3028
- Rayson GD, Williams PA** (2011) Comparative Metal Ion Binding to Native and Chemically Modified *Datura innoxia* Immobilized Biomaterials, *Biomaterials - Physics and Chemistry*, Prof. Rosario Pignatello (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/24925
- Rojas de Astudillo L, Chang Yen I, Bekele I** (2005) Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Revista de Biología Tropical* **53**: 41-51
- Romera E, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA** (2007) Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresource Technology* **98**: 3344-3353
- Rosowski JR, Hoshaw RW** (1970) Cultivation of a filamentous alga in quantity on agar plates. *J Phycol* **6**: 219-221
- Rothschild LJ, Mancinelli RL** (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101
- Safonova E, Kvitko KV, Iankevitch MI, Surgko LF, Afti IA, Reisser W** (2004) Biotreatment of Industrial Wastewater by Selected Algal-Bacterial Consortia. *Eng Life Sci* **4**: 347-353
- Sahneh FD, Scoglio C, Riviere J** (2013) Dynamics of nanoparticle-protein corona complex formation: analytical results from population balance equations. *PLoS ONE* **8**: e64690
- Saifullah A, Karim MA, Ahmad-Yazid A** (2014) Microalgae: An alternative source of renewable

- energy. *Am J Eng Res* **3**: 330–338
- Sánchez-Andrea, I., Rojas-Ojeda, P., Amils, R., Sanz, J.L.** (2012) Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River. *Extremophiles*, **16**: 829–839.
- Sandau E, Sandau P, Pulz O, Zimmermann M** (1996) Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products. *Eng Life Sci* **16**: 103–119
- Sandmann G, Böger P** (1980) Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **98**: 53–59
- Sanghi R, Verma P** (2009) Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technology* **100**: 501–504
- Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, Parra LP** (2016) Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in microbiology* **7**(1408): 1–32
- Schmitt F-J, Renger G, Friedrich T, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Los DA, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI** (2014) Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**: 835–848
- Schouten S, Baas M, Hopmans EC, Reysenbach A-L, Damsté JSS** (2008) Tetraether membrane lipids of *Candidatus Aciduliprofundum boonei*, a cultivated obligate thermoacidophilic euryarchaeote from deep-sea hydrothermal vents. *Extremophiles* **12**: 119–124
- Seckbach J, Rampelotto PH** (2015) Polyextremophiles. *Microbial evolution under extreme conditions* **2**: 153–170
- Shanab S, Essa A, Shalaby E** (2012) Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior* **7**: 392–399
- Shankar PD, Shobana S, Karuppusamy I, Pugazhendhi A, Ramkumar VS, Arvindnarayan S, Kumar G** (2016) A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: formation mechanism and applications. *Enzyme and Microbial Technology* **95**: 28–44
- Shannon CE, Weaver W** (1948) A mathematical theory of communication. *Bell system technical journal* **27**: 623–656
- Sharma A, Kawarabayasi Y, Satyanarayana T** (2012) Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles* **16**: 1–19
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y** (2009) Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **145**: 83–96
- Shioi Y, Tamai H, Sasa T** (1978) Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **19**: 203–209
- Sintubin L, Verstraete W, Boon N** (2012) Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnol Bioeng* **109**: 2422–2436
- Sivakumar G, Jeong K, Lay JO** (2014) Bioprocessing of *Stichococcus bacillaris* strain siva2011. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 62–62

- Škaloud P, Nemcová Y, Pytela J** (2014) *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential. *Fottea* **14**(1): 53-62
- Škaloud P, Friedl T, Hallmann C, Beck A, Dal Grande F** (2016) Taxonomic revision and species delimitation of coccoid green algae currently assigned to the genus *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* **52**: 599-617
- Skowroński T, Szubińska S, Pawlik B, Jakubowski M, Bilewicz R, Cukrowska E** (1991) The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environmental Pollution* **74**: 89-100
- Smith GM** (1913) Tetrademus, a new four-celled coenobitic alga. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. **40**: 75-87
- Sommaruga S, Galbiati E, Peñaranda-Avila J, Brambilla C, Tortora P, Colombo M, Prosperi D** (2014) Immobilization of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* on magnetic nanoparticles improves enzyme stability and functionality in organic media. *BMC biotechnology* **14**(82): 1-9
- Sondi I, Salopek-Sondi B** (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **275**: 177-182
- Sotiriou GA, Pratsinis SE** (2010) Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environ Sci Technol* **44**: 5649-5654
- Sotiriou GA, Teleki A, Camenzind A, Krumeich F, Meyer A, Panke S, Pratsinis SE** (2011) Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area. *Chemical Engineering Journal* **170**: 547-554
- Sowjanya K** (2015) A Review on Current Advancements in Nanotechnology. *Journal of Medical and Health Sciences* **4**: 1-12
- Stark WJ, Stoessel PR, Wohlleben W, Hafner A** (2015) Industrial applications of nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **44**: 5793-5805
- Starý J, Havlik B, Kratzer K, Prášilová J, Hanušová J** (1983) Cumulation of zinc, cadmium and mercury on the alga *Scenedesmus obliquus*. *CLEAN-Soil, Air, Water* **11**: 401-409
- Stedmon CA, Markager S** (2005) Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnology and Oceanography* **50**: 1415-1426
- Stockner JG, Antia NJ** (1976) Phytoplankton adaptation to environmental stresses from toxicants, nutrients, and pollutants—a warning. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **33**: 2089-2096
- Subramaniam V, Subashchandrabose SR, Thavamani P, Chen Z, Krishnamurti GSR, Naidu R, Megharaj M** (2016) Toxicity and bioaccumulation of iron in soil microalgae. *Journal of Applied Phycology* **28**: 2767-2776
- Sun L, Wang L, Zhou Y** (2012) Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers* **87**: 1206-1210
- Sunda WG** (2012) Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Frontiers in microbiology* **3**(204): 1-22

- Sunkar S, Nachiyar CV** (2012) Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**: 953–959
- Suriyaraj SP, Vijayaraghavan T, Biji P, Selvakumar R** (2014) Adsorption of fluoride from aqueous solution using different phases of microbially synthesized TiO₂ nanoparticles. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2**: 444–454
- Tang WL, Zhao H** (2009) Industrial biotechnology: tools and applications. *Biotechnology journal* **4**: 1725–1739
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882
- Tran QH, Le A-T** (2013) Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* **4** (3) 10.1088/2043-6262/4/3/033001
- Tukaj Z, Baścik-Remisiewicz A, Skowroński T, Tukaj C** (2007) Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: a study at low and elevated CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 291–299
- Van Den Burg B** (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology* **6**: 213–218
- Vidhu VK, Philip D** (2014) Catalytic degradation of organic dyes using biosynthesized silver nanoparticles. *Micron* **56**: 54–62
- Vilela D, González MC, Escarpa A** (2012) Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Analytica chimica acta* **751**: 24–43
- Waltz E** (2009) Biotech's green gold? *Nature Biotechnology* **27**: 15–18
- Wang H-MD, Chen C-C, Huynh P, Chang J-S** (2015) Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology* **184**: 355–362
- Wang W** (1987) Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms—overview. *Environment International* **13**: 437–457
- Whittaker RH** (1960) Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs* **30**: 279–338
- Whittaker RJ, Willis KJ, Field R** (2001) Scale and Species Richness: Towards a General, Hierarchical Theory of Species Diversity. *Journal of Biogeography* **28**: 453–470
- Wijffels RH, Barbosa MJ** (2010) An outlook on microalgal biofuels. *Science* **329**: 796–799
- Wilde EW, Benemann JR** (1993) Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances* **11**: 781–812
- Wold S, Esbensen K, Geladi P** (1987) Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **2**: 37–52
- Wynne MJ, Hallan JK** (2016) Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Report* **126**: 83–86

- Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M, Takriff MS** (2014) An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* **21**(6): 1-10
- Yim JH, Kim SJ, Ahn SH, Lee CK, Rhie KT, Lee HK** (2004) Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Marine biotechnology* **6**: 17-25
- Yun J, Kim J, Kojori HS, Kim SJ, Tong C, Anderson WA** (2013) Current enhancement of aluminum doped ZnO/n-Si isotype heterojunction solar cells by embedding silver nanoparticles. *j nanosci nanotechnol* **13**: 5547-5551
- Zakhama S, Dhaouadi H, M'henni F** (2011) Nonlinear modelisation of heavy metal removal from aqueous solution using *Ulva lactuca* algae. *Bioresource Technology* **102**: 786-796
- Zamborini FP, Bao L, Dasari R** (2012) Nanoparticles in measurement science. *Anal Chem* **84**: 541-576
- Zeraatkar AK, Ahmadzadeh H, Talebi AF, Moheimani NR, McHenry MP** (2016) Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management* **181**: 817-831
- Zhang H, Bhattacharya D, Lin S** (2005) Phylogeny of dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J Phycol* **41**: 411-420
- Zhang Q, Huang JQ, Qian WZ, Zhang YY, Wei F** (2013a) The road for nanomaterials industry: A review of carbon nanotube production, post-treatment, and bulk applications for composites and energy storage. *Small* **9**: 1237-1265
- Zhang W, Xiong B, Chen L, Lin K, Cui X, Bi H, Guo M, Wang W** (2013b) Toxicity assessment of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* following exposure to Pb(II). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **36**: 51-57

ANEXO I

DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA ZONA DE INFLUENCIA MAREAL

a. Análisis físico-químicos y elemental

Figura 1. Gráfica de sedimentación de las componentes extraídas en la PCA de las variables físico-químicas medidas *in situ* y del análisis elemental para la búsqueda de la zona de influencia mareal en el estuario del río Tinto de los puntos de muestreo desde La Palma del Condado hasta La Rábida. En el texto, apartado 4.1.3, Figs. 10 y 11.

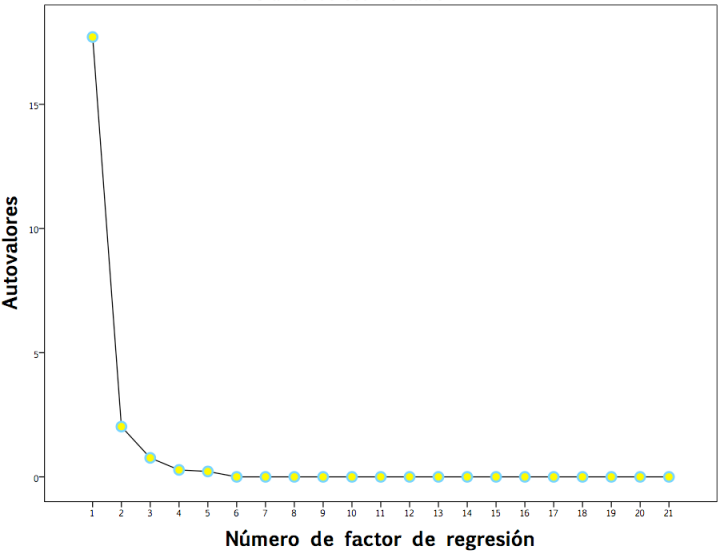


Tabla 1. Varianza total explicada de la PCA de las muestras a las que se refiere en el texto, apartado 4.1.3, Figs. 10 y 11.

FDR ¹²	Autovalores iniciales	% de la varianza	% acumulado
1	17,712	84,343	84,343
2	2,025	9,641	93,985
3	0,765	3,643	97,627
4	0,28	1,334	98,962
5	0,218	1,038	100
6	1,03E-13	1,14E-13	100
7	1,01E-13	1,03E-13	100
8	1,01E-13	1,02E-13	100
9	1,00E-13	1,02E-13	100
10	1,00E-13	1,02E-13	100
11	1,00E-13	1,01E-13	100
12	1,00E-13	1,00E-13	100
13	-1,00E-13	-1,00E-13	100
14	-1,00E-13	-1,01E-13	100
15	-1,00E-13	-1,01E-13	100
16	-1,00E-13	-1,02E-13	100
17	-1,00E-13	-1,02E-13	100
18	-1,01E-13	-1,02E-13	100
19	-1,01E-13	-1,03E-13	100
20	-1,02E-13	-1,09E-13	100

¹² FDR=Factor de Regresión

Tablas 2 y 3. 2) Matriz de componentes y 3) Matriz de coeficientes para cálculo de las puntuaciones en las componentes la PCA de las muestras a las que se refiere en el texto en el apartado 4.1.3, Figs. 10 y 11.

	Matriz Componentes	
	1	2
Al	0,996	0,041
Si	0,189	0,744
P	0,988	0,026
S	0,984	-0,019
Cl	0,999	-0,021
K	0,998	-0,015
Ca	0,982	-0,059
Ti	-0,249	0,889
Mn	-0,989	0,108
Fe	-0,969	0,213
Ni	-0,907	0,136
Cu	-0,986	0,101
Zn	-0,984	0,089
As	0,927	-0,082
Br	1	-0,009
Sr	0,99	0,008
pH	0,993	0,038
Cond	0,975	0,122
Sal	0,988	0,096
Eh	-0,977	-0,159

3

	Coeficientes para el cálculo de las puntuaciones factoriales	
	1	2
Al	0,056	0,02
Si	0,011	0,367
P	0,056	0,013
S	0,056	-0,009
Cl	0,056	-0,011
K	0,056	-0,008
Ca	0,055	-0,029
Ti	-0,014	0,439
Mn	-0,056	0,053
Fe	-0,055	0,105
Ni	-0,051	0,067
Cu	-0,056	0,05
Zn	-0,056	0,044
As	0,052	-0,04
Br	0,056	-0,005
Sr	0,056	0,004
pH	0,056	0,019
Cond	0,055	0,06
Sal	0,056	0,047
Eh	-0,055	-0,078

b. Diversidad biológica

Siguen las librerías genómicas asociadas a las dos zonas estudias SJP (San Juan del Puerto) y RAB (La Rábida) en cada muestreo con nomenclatura indicada a continuación:

- MA/A = Marea alta
- MB/B = Marea baja
- MM/M = Marea media
- PRIM/P = Primavera
- VER/V = Verano
- OTO/O = Otoño
- INV/I = Invierno
- C = cobertura
- e = valor e
- % S = porcentaje de similitud

Tabla 4. Genoteca de las muestras SJP_PRIM_MA

SJP PRIM_MA	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
P_A_1	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
P_A_10	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_101	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF804091.1
P_A_102	Methylophaga frappieri strain JAM7 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_103	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1
P_A_105	Haematobacter massiliensis strain 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
P_A_106	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_107	Rhodobacter sp. R18 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	95%	AB607872.1
P_A_108	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_11	Haematobacter Assiliensis strain FraBoise 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
P_A_110	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EF508371.1
P_A_111	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	96%	CP000663.1
P_A_112	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	98%	AY244771.1
P_A_114	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
P_A_115	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	100%	0,0	98%	CP003380.1
P_A_117	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
P_A_119	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_12	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_121	Halothiobacillus neapolitanus strain Parker strain X 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_104929.1
P_A_122	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	98%	CP003380.1
P_A_123	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_124	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_125	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	99%	CP003380.1
P_A_126	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	KF790925.1
P_A_127	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_128	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
P_A_13	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	0,0	97%	AY244771.1
P_A_130	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KF371656.1
P_A_131	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_132	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	99%	CP003380.1
P_A_133	Methylophaga frappieri strain JAM7 16S ribosomal RNA, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_134	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
P_A_135	Halothiobacillus neapolitanus strain Parker strain X 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	97%	NR_104929.1
P_A_136	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	98%	CP003380.1
P_A_139	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	0,99	0,0	97%	CP003380.1
P_A_14	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	KF790925.1
P_A_140	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1
P_A_142	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
P_A_143	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
P_A_15	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	98%	CP000663.1
P_A_16	Rhodobacter sp. R7K3Z5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	EU604756.1
P_A_17	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_18	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_19	Rhodobacter sp. CR07-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	EU979473.1
P_A_2	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	KF790925.1
P_A_20	Haematobacter massiliensis strain 16S ribosoA RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
P_A_21	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_22	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_23	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1
P_A_24	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	98%	AM110988.1
P_A_25	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU564843.1
P_A_26	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KF371656.1
P_A_27	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1

P_A_28	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	96%	CP000663.1
P_A_29	Methylophaga frappieri strain JAM7 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_3	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
P_A_30	Rhodobacter sp. CR07-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	EU979473.1
P_A_31	Nitrateductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	EU564843.1
P_A_32	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	KF371656.1
P_A_33	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_34	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	FJ872534.1
P_A_35	Rhodobacter sp. R7K3Z5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	EU604756.1
P_A_36	Rhodobacter sp. zf-34-I partial 16S rRNA gene, isolate zf-34-I	99%	0,0	97%	AM292058.1
P_A_37	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,96	0,0	98%	AY244771.1
P_A_38	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_39	Nitrateductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU564843.1
P_A_4	Dyella ginsengisoli strain HPB-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU809978.1
P_A_40	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	95%	FJ872534.1
P_A_41	Nitrateductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU564843.1
P_A_42	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_43	Halothiobacillus neapolitanus strain Parker strain X 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	94%	NR_104929.1
P_A_44	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	99%	CP003380.1
P_A_45	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_46	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_47	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1
P_A_48	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	KF371656.1
P_A_49	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	96%	CP000663.1
P_A_5	Haemobacter massiliensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
P_A_50	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	95%	FJ872534.1
P_A_51	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	94%	KF371656.1
P_A_52	Rhodobacter sp. R7K3Z5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU604756.1
P_A_53	Flavobacteriaceae bacterium CZ1127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	FJ526380.1
P_A_54	Methylophaga frappieri 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,98	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_54	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	100%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_55	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_56	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
P_A_57	Methylophaga frappieri 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_58	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	AY244771.1
P_A_59	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	98%	CP003380.1
P_A_6	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_60	Rhodobacter sp. CR07-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	EU979473.1
P_A_61	Rhodobacter sp. R18 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB607872.1
P_A_61	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	FJ872534.1
P_A_62	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF804091.1
P_A_63	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	94%	KF790925.1
P_A_64	Methylomonas clara partial 16S rRNA gene, strain DSM 6330	99%	0,0	99%	HF564897.1
P_A_65	Rhodobacter sp. R18 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	97%	AB607872.1
P_A_66	Rhodobacter sp. zf-34-I partial 16S rRNA gene, isolate zf-34-I	99%	0,0	98%	AM292058.1
P_A_67	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	AY244771.1
P_A_68	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	FJ872534.1
P_A_69	Rhodobacter sp. R7K3Z5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU604756.1
P_A_7	Halothiobacillus neapolitanus 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1	0,0	98%	NR_104929.1
P_A_70	Dyella ginsengisoli strain HPB-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU809978.1
P_A_71	Nitrateductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	EU564843.1
P_A_72	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF804091.1
P_A_73	Methylophaga frappieri strain JAM7 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_121698.1
P_A_74	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	96%	CP000663.1
P_A_75	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025 plasmid pRSPA02, complete sequence	100%	0,0	96%	CP000663.1
P_A_76	Gama proteobacterium OS-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	EF612351.1
P_A_77	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_78	Rhodobacter sp. CR07-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	EU979473.1
P_A_79	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	95%	FJ872534.1

P_A_8	Marinomonas pontica strain 46-16 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_042965.1
P_A_80	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_81	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	95%	CP003380.1
P_A_82	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	98%	CP003380.1
P_A_83	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU564843.1
P_A_84	Rhodobacter sp. R18 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB607872.1
P_A_85	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_86	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	97%	CP003380.1
P_A_88	M. squamata DNA for 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile & tRNA-Ala genes	99%	0,0	99%	X90641.1
P_A_89	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF804091.1
P_A_9	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100%	0,0	98%	CP001801.1
P_A_91	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
P_A_96	Methylophaga frappieri strain JAM7, complete genome	99%	0,0	98%	CP003380.1

Tabla 5. Genoteca de las muestras SJP_PRIM_MB

SJP PRIM_MB	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
P_B_11	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_12	Acid streamer iron-oxidizing bacterium CS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_13	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_14	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_15	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	HM769774.1
P_B_16	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_16	Acid streamer iron-oxidizing bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_17	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	HM769774.1
P_B_18	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_19	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1
P_B_2	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_20	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	83%	HM769774.1
P_B_21	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_22	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_23	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	HM769774.1
P_B_24	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1
P_B_25	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_26	Acidiphilium multivorum 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_27	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1
P_B_28	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1
P_B_29	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_3	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_30	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_32	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	HM769774.1
P_B_33	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	HM769774.1
P_B_35	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1
P_B_36	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	HM769774.1
P_B_37	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1
P_B_4	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_46	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_47	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1

P_B_48	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_51	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_51	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1
P_B_52	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_53	Acid streamer iron-oxidizing bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_54	Acid streamer iron-oxidizing bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_55	Acidiphilium multivorum 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_6	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
P_B_60	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	83%	HM769774.1
P_B_61	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_63	Acidovorax sp. 16S rRNA gene, isolate G8B1	100%	0,0	97%	AJ012071.1
P_B_64	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1
P_B_65	Acidiphilium multivorum 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_67	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_68	Acid streamer iron-oxidizing bacterium CS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_7	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AF376021.1
P_B_75	Acid streamer iron-oxidizing bacterium CS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,0	97%	AY765999.2
P_B_76	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_074327.1
P_B_8	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	HM769774.1
P_B_88	Acid streamer iron-oxidizing bacterium CS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY765999.2
P_B_89	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1
P_B_9	Ferrimicrobium sp. Mc9KI-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM769774.1

Tabla 6. Genoteca de las muestras SJP_VER_MA

SJP VER_MA	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
V_A_1	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	99%	CP006615.1
V_A_10	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_11	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 chromosome 2, complete sequence	94%	0,0	93%	CP000144.2
V_A_12	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_102873.1
V_A_13	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	99%	KF040403.1
V_A_14	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_15	Rhodobaca bogoriensis strain SLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	EU908048.1
V_A_16	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_17	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
V_A_18	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
V_A_19	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	97%	NR_102873.1
V_A_19	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_1a	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_2	Arcobacter nitrofigilis strain 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_20	Paracoccus sp. BSw21438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	GQ199611.1
V_A_21	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 chromosome 2, complete sequence	94%	0,0	98%	CP000144.2
V_A_22	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
V_A_23	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
V_A_24	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
V_A_25	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EU564843.1

V_A_26	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_27	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_28	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_29	Thermobaculum terrenum strain ATCC BAA-798 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074347.1
V_A_3	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	EU564843.1
V_A_30	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	99%	KF040403.1
V_A_31	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF371656.1
V_A_32	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_33	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	97%	KF040403.1
V_A_34	Thauera aroatica 16S rRNA gene, strain LG356	99%	0,0	99%	AJ315680.1
V_A_35	Thermobaculum terrenum strain ATCC BAA-798 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074347.1
V_A_36	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	EU564843.1
V_A_37	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	98%	KF040403.1
V_A_38	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_39	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_4	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_41	Rhodomonas salina strain CCMP1319 chloroplast, complete genome	100%	0,0	97%	EF508371.1
V_A_42	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074106.1
V_A_43	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 chromosome 2, complete sequence	94%	0,0	98%	CP000144.2
V_A_44	Pseudomonas sp. B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0,0	99%	EU162043.1
V_A_45	Paracoccus sp. BSw21438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	GQ199611.1
V_A_46	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_47	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	KF371656.1
V_A_48	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
V_A_49	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	97%	NR_102873.1
V_A_5	Thauera aroatica 16S rRNA gene, strain LG356	99%	0,0	99%	AJ315680.1
V_A_50	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074106.1
V_A_51	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	97%	KF040403.1
V_A_52	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
V_A_53	Thauera aroatica 16S rRNA gene, strain LG356	99%	0,0	97%	AJ315680.1
V_A_54	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_55	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_56	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_57	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_58	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_59	Pseudomonas sp. B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0,0	97%	EU162043.1
V_A_6	Paracoccus sp. BSw21438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	98%	GQ199611.1
V_A_60	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_61	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	98%	KF040403.1
V_A_62	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KF371656.1
V_A_63	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	EU564843.1
V_A_64	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KF371656.1
V_A_65	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	98%	KF040403.1
V_A_66	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,98	0,0	99%	KF371656.1
V_A_67	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	90%	0,0	97%	KF040403.1
V_A_68	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1

V_A_70	Methylophaga sp. RS-MM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	KF371656.1
V_A_71	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_72	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
V_A_75	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU564843.1
V_A_77	Rhodomonas salina strain CCMP1319 chloroplast, complete genome	100%	0,0	97%	EF508371.1
V_A_8	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
V_A_80	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU564843.1
V_A_83	Paracoccus sp. BSw21438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	96%	GQ199611.1
V_A_85	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_86	Ralstonia sp. M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AY864081.1
V_A_87	Rhodobaca bogoriensis strain SLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU908048.1
V_A_90	Rhodobacter sp. 2002-65602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_041886.1
V_A_91	Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 chromosome 2, complete sequence	94%	0,0	98%	CP000144.2
V_A_95	Thauera aroatica 16S rRNA gene, strain LG356	99%	0,0	99%	AJ315680.1

Tabla 7. Genoteca de las muestras SJP_VER_MB

SJP VER_MB	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
V_B_1	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	98%	X91797.1
V_B_112	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_114	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_115	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_117	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_16	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_18	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_2	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	89%	0,0	97%	KF040403.1
V_B_21	Bacillus muriArtini strain LMG 21005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0,0	97%	NR_042084.1
V_B_22	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	72%	AP012978.1
V_B_27	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_28	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_29	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074281.1
V_B_3	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	98%	AP012048.1
V_B_30	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_31	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	95%	NR_102452.1
V_B_32	HaloplasAtales bacterium 4B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	99%	KC164515.1
V_B_34	Haliae sp. ETY-M gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB646259.1
V_B_36	Arcobacter sp. JNU-H033 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	76%	0,0	98%	KC121364.1
V_B_37	Arcobacter sp. 16S rRNA gene, clone A3b2	95%	0,0	97%	AJ271655.1
V_B_38	Roseicetium antarcticum strain ZS2-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	NR_116571.1
V_B_41	Clostridium sp. K12-15-18 partial 16S rRNA gene, clone K12-15-18	96%	0,0	99%	HE862233.1
V_B_42	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	97%	0,0	99%	X91797.1
V_B_48	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	98%	NR_025764.1
V_B_50	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_51	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_52	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	97%	X91797.1
V_B_53	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_55	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	97%	0,0	99%	X91797.1
V_B_58	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_62	Paenochrobactrum sp. 280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	97%	KC494696.1
V_B_64	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	100 %	0,0	99%	X91797.1
V_B_65	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074281.1
V_B_67	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_68	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_70	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_72	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1

V_B_74	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	97%	NR_025764.1
V_B_76	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	98%	AP012048.1
V_B_78	HaloplasAtales bacterium 4B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	99%	KC164515.1
V_B_79	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	98%	NR_025764.1
V_B_81	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	99%	AP012048.1
V_B_82	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	99%	AP012048.1
V_B_84	HaloplasAtales bacterium 4B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	KC164515.1
V_B_87	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	99%	X91797.1
V_B_89	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	89%	0,0	99%	KF040403.1
V_B_94	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_10	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	98%	X91797.1
V_B_11	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074106.1
V_B_12	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_13	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	98%	X91797.1
V_B_14	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_15	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074106.1
V_B_17	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	NR_025764.1
V_B_19	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	100 %	0,0	99%	X91797.1
V_B_20	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074106.1
V_B_23	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_24	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	97%	0,0	99%	X91797.1
V_B_25	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_26	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074281.1
V_B_30	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074281.1
V_B_31	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_33	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_35	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_39	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	97%	X91797.1
V_B_4	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_43	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_44	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_45	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_46	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_47	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	91%	NR_025764.1
V_B_49	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_5	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_54	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_56	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_57	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	97%	0,0	99%	X91797.1
V_B_59	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
V_B_6	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_60	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_61	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	99%	X91797.1
V_B_63	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	98%	AP012978.1
V_B_66	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_69	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	97%	0,0	99%	X91797.1
V_B_7	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_71	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_73	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	92%	0,0	99%	X91797.1
V_B_75	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074281.1
V_B_77	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	97%	X91797.1
V_B_78	Acidocella sp. 16S ribosomal RNA gene	98%	0,0	99%	X91797.1
V_B_8	Haliea sp. ETY-M gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB646259.1

V_B_100	Roseicetium antarcticum strain ZS2-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	97%	NR_116571.1
V_B_101	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	99%	AP012048.1
V_B_102	Arcobacter sp. 16S rRNA gene, clone A3b2	95%	0,0	98%	AJ271655.1
V_B_103	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_104	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_105	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	89%	0,0	99%	KF040403.1
V_B_99	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	97%	AP012048.1
V_B_107	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_108	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	89%	0,0	99%	KF040403.1
V_B_109	Aquicella siphonis strain SGT-108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	98%	NR_025764.1
V_B_110	Bacillus muriArtini strain LMG 21005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0,0	99%	NR_042084.1
V_B_111	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
V_B_113	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0,0	99%	NR_036801.1
V_B_115	Arcobacter sp. JNU-H033 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	76%	0,0	98%	KC121364.1
V_B_117	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	97%	AP012048.1
V_B_120	Halothiobacillus neapolitanus c2, complete genome	100 %	0,0	98%	CP001801.1
V_B_121	Clostridium sp. K12-15-18 partial 16S rRNA gene, clone K12-15-18	96%	0,0	97%	HE862233.1
V_B_123	Paenochrobactrum sp. 280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	98%	KC494696.1
V_B_125	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	97%	AP012048.1

Tabla 8. Genoteca de las muestras SJP_OTO_MA

SJP OTO_MA	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
O_A_1	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	98%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_10	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	98%	EU410957.1
O_A_100	Arcobacter nitrofigilis DSM 7299, complete genome	99%	0,0	98%	CP001999.1
O_A_101	Arcobacter cryaerophilus strain CCUG 12018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EF064151.1
O_A_102	Arcobacter nitrofigilis DSM 7299, complete genome	99%	0,0	97%	CP001999.1
O_A_105	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_106	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	97%	NR_102873.1
O_A_107	Methylophaga nitratireducenticrescens strain JAM1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	96%	NR_074321.1
O_A_11	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	98%	CP006615.1
O_A_112	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_113	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	99%	AP012048.1
O_A_115	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_116	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	96%	AP012048.1
O_A_117	Arcobacter cryaerophilus strain CCUG 12018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EF064151.1
O_A_118	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	99%	EU410957.1
O_A_12	Arinobacter sp. p78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	98%	EU864262.1
O_A_120	Arinobacter sp. p78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	98%	EU864262.1
O_A_122	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_123	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_124	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_126	ChroAtocurvus halOlerans strain EG19 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_115058.1
O_A_127	Arcobacter nitrofigilis DSM 7299, complete genome	99%	0,0	99%	CP001999.1
O_A_128	Arinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074765.1
O_A_129	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	97%	AP012048.1
O_A_13	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	96%	EU410957.1

O_A_131	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_132	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	97%	NR_102873.1
O_A_133	Arinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074765.1
O_A_134	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KF790925.1
O_A_136	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	98%	CP006615.1
O_A_137	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_139	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	98%	CP006615.1
O_A_14	Iodide-oxidizing bacterium RB-2A gene for 16S rRNA, partial sequence	98%	0,0	99%	AB159203.1
O_A_140	Marinomonassp. NF4-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	FJ889617.1
O_A_142	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,99	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_143	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_144	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_145	ChroAtocurvus halOlerans strain EG19 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_115058.1
O_A_149	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_102873.1
O_A_15	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	98%	AP012048.1
O_A_150	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_151	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_153	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_154	Methylophaga Arina strain ATCC 35842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_026252.1
O_A_155	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	98%	EU410957.1
O_A_156	Methylophaga Arina strain ATCC 35842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_026252.1
O_A_158	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AM402960.1
O_A_159	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_16	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_160	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_162	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_163	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_164	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074106.1
O_A_165	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_036801.1
O_A_167	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	97%	EU410957.1
O_A_168	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_17	Methylophaga nitratireducentiscrescens strain JAM1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074321.1
O_A_170	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_172	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_173	Marinomonassp. NF4-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	FJ889617.1
O_A_175	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	0,97	0,0	97%	FR682100.2
O_A_19	GamA proteobacterium Mo4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU672862.1
O_A_2	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_20	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	98%	AM236326.1
O_A_21	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_22	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	98%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_23	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	0,99	0,0	97%	CP006615.1
O_A_24	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_25	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_26	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_036801.1
O_A_27	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	92%	0,0	98%	FR682100.2
O_A_28	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_29	Arinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074765.1
O_A_3	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	97%	AM236326.1
O_A_30	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	97%	AM236326.1

O_A_31	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_32	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_33	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_34	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_35	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	97%	AM236326.1
O_A_36	Arcobacter cryaerophilus strain CCUG 12018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EF064151.1
O_A_37	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_38	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_39	ChroAtocurvus halOlerans strain EG19 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_115058.1
O_A_4	Alpha proteobacterium IMCC10400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0,0	97%	FJ532492.1
O_A_40	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AM402960.1
O_A_41	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_42	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_43	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	99%	NR_102873.1
O_A_44	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KF790925.1
O_A_45	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	98%	AM236326.1
O_A_46	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	98%	CP006615.1
O_A_47	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	97%	NR_116730.1
O_A_48	Arcobacter cryaerophilus strain CCUG 12018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EF064151.1
O_A_49	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	97%	AM236326.1
O_A_5	Arinobacter sp. p78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	98%	EU864262.1
O_A_50	Candidatus Aquiluna rubra partial 16S rRNA gene, strain MWH-Cank2	96%	0,0	97%	AM999977.1
O_A_51	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0,0	98%	NR_116730.1
O_A_52	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	99%	AM236326.1
O_A_53	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_54	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_036801.1
O_A_55	Arcobacter nitrofigilis DSM 7299, complete genome	0,99	0,0	97%	CP001999.1
O_A_56	Methylophaga Arina strain ATCC 35842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_026252.1
O_A_57	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_116730.1
O_A_58	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_59	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_6	Donghicola xiamenensis strain Y-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_043565.1
O_A_61	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_116730.1
O_A_62	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_63	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_64	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	98%	0,0	97%	CP006615.1
O_A_65	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_66	Arcobacter butzleri 7h1h, complete genome	99%	0,0	98%	CP006615.1
O_A_67	Arcobacter cryaerophilus strain CCUG 12018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	EF064151.1
O_A_68	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_69	Arcobacter nitrofigilis DSM 7299, complete genome	99%	0,0	98%	CP001999.1
O_A_7	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_70	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_71	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_72	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	0,0	98%	NR_102873.1
O_A_73	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_74	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	98%	AP012048.1

O_A_75	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	99%	EU410957.1
O_A_76	Methylophaga Arina strain ATCC 35842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_026252.1
O_A_77	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	97%	EU410957.1
O_A_78	ChroAtocurvus halOlerans strain EG19 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_115058.1
O_A_79	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_8	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_80	Donghicola xiamenensis strain Y-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_043565.1
O_A_81	Arinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074765.1
O_A_82	Arinobacter sp. p78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	98%	EU864262.1
O_A_83	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_84	Candidatus Aquiluna rubra partial 16S rRNA gene, strain MWH-CanK2	96%	0,0	98%	AM999977.1
O_A_85	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_86	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_A_87	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_88	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_A_89	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	97%	0,0	99%	FR682100.2
O_A_90	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_A_91	Iodide-oxidizing bacterium RB-2A gene for 16S rRNA, partial sequence	98%	0,0	99%	AB159203.1
O_A_91	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074106.1
O_A_92	Iodide-oxidizing bacterium RB-2A gene for 16S rRNA, partial sequence	98%	0,0	99%	AB159203.1
O_A_92	Iodide-oxidizing bacterium RB-2A gene for 16S rRNA, partial sequence	98%	0,0	99%	AB159203.1
O_A_93	Methylophaga Arina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_036801.1
O_A_94	Alpha proteobacterium IMCC10400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0,0	97%	FJ532492.1
O_A_95	Alpha proteobacterium IMCC10400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0,0	97%	FJ532492.1
O_A_97	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	92%	EU410957.1
O_A_98	Methylophaga nitratreducenticrescens strain JAM1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074321.1
O_A_99	Methylophaga nitratreducenticrescens strain JAM1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074321.1

Tabla 9. Genoteca de las muestras SJP_OTO_MB

SJP OTO_MB	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
O_B_1	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	98%	AM402960.1
O_B_10	Methylophaga aminisulfivorans strain MP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AM402960.1
O_B_100	Acidocella aluminiidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112716.1
O_B_101	Acidocella aluminiidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_112716.1
O_B_101	Acidiphilium sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	99%	AY766000.2
O_B_102	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	98%	AP012978.1
O_B_102	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_103	Marinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074765.1
O_B_104	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_105	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_105	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	DQ145976.1
O_B_106	Acidiphilium sp. BGR 75a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU167999.1
O_B_107	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	95%	NR_036801.1
O_B_109	Acidocella aluminiidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_112716.1
O_B_11	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ145976.1
O_B_110	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ145976.1

O_B_112	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	74%	0,0	97%	NR_074327.1
O_B_114	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_115	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	95%	NR_074106.1
O_B_117	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	KF790925.1
O_B_118	Acidiphilium sp. BGR 75a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU167999.1
O_B_119	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	99%	NR_102452.1
O_B_12	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_120	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074327.1
O_B_121	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_122	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	95%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_124	Acidiphilium sp. MPH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AF352794.1
O_B_126	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	32%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_127	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_128	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	98%	AP012978.1
O_B_129	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_13	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_116730.1
O_B_130	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0%	96%	DQ145976.1
O_B_131	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_036801.1
O_B_134	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,0	98%	NR_112716.1
O_B_135	Denitromonas indolicum strain MPKc 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	AY972852.1
O_B_136	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_137	Acidiphilium sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	97%	AY766000.2
O_B_138	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	89%	0,0	98%	NR_074327.1
O_B_139	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074327.1
i	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KF790925.1
O_B_141	Acidobacterium capsulatum strain ATCC 51196 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074106.1
O_B_143	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_145	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_146	Clostridiales bacterium KM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	HM231145.1
O_B_147	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	98%	AP012978.1
O_B_15	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	99%	NR_102873.1
O_B_16	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	95%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_17	Acidiphilium sp. WJ52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	AY495956.1
O_B_17_1	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	32%	0%	97%	NR_074327.1
O_B_18	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_19	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_112716.1
O_B_2	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_20	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_21	Luteimonas sp. CHNTR51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ337599.1
O_B_22	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0%	98%	EU564843.1

O_B_23	Acidiphilium sp. WJ52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	AY495956.1
O_B_24	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_25	Marinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074765.1
O_B_26	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_27	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	97%	AM402960.1
O_B_28	Acidiphilium sp. WJ52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	AY495956.1
O_B_29	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074327.1
O_B_3	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,0	99%	KF790925.1
O_B_30	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	95%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_31	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_32	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	KF790925.1
O_B_33	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	98%	AP012978.1
O_B_34	Acidiphilium syBioticum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	AY632901.1
O_B_34	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_112716.1
O_B_35	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_112716.1
O_B_35	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_112716.1
O_B_36	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_37	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	95%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_38	Alpha proteobacterium CRIB-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	DQ123619.1
O_B_39	Alpha proteobacterium CRIB-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	DQ123619.1
O_B_4	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_112716.1
O_B_40	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_41	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_42	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074327.1
O_B_43	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	98%	NR_102873.1
O_B_44	Acidiphilium sp. BGR 75a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU167999.1
O_B_45	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,99	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_46	Acidiphilium sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	98%	AY766000.2
O_B_47	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	97%	AP012048.1
O_B_48	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	DQ145976.1
O_B_49	Alpha proteobacterium CRIB-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	DQ123619.1
O_B_5	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_5_1	Mesorhizobium australicum strain WSM2073 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96%	0,0	99%	NR_102452.1
O_B_50	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_51	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074327.1
O_B_52	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_53	Marinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074765.1
O_B_54	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_55	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_56	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KF790925.1
O_B_57	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_116730.1

O_B_58	Alpha proteobacterium CRIB-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	DQ123619.1
O_B_59	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ145976.1
O_B_6	Acidiphilium sp. WJ52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	AY495956.1
O_B_60	Methylophaga aminisulfivorans strain MP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	AM402960.1
O_B_61	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,89	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_62	Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckeriae partial 16S rRNA gene, clone M12.2	99%	0,0	98%	AM402960.1
O_B_63	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_64	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	97%	NR_102873.1
O_B_65	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_66	Rhodomonas salina strain CCMP1319 chloroplast, complete genome	99%	0%	99%	EF508371.1
O_B_67	Arcobacter sp. L DNA, complete genome	99%	0,0	96%	AP012048.1
O_B_68	Flavobacterium cucumis strain R2A45-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_044107.1
O_B_69	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_7	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_70	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_71	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	74%	0,0	97%	NR_074327.1
O_B_72	Acidiphilium sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	99%	AY766000.2
O_B_73	Marinobacter adhaerens strain HP15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	98%	NR_074765.1
O_B_74	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	AM402960.1
O_B_75	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_116730.1
O_B_76	Arcobacter bivalviorum strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_116730.1
O_B_77	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_78	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_79	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_8	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	KF790925.1
O_B_80	Acidiphilium sp. MPH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	AF352794.1
O_B_81	Acidiphilium sp. BGR 75a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	GU167999.1
O_B_82	Luteimonas sp. CHNTR51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ337599.1
O_B_83	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_84	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_036801.1
O_B_85	Acidiphilium multivorum strain AIU301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	99%	NR_074327.1
O_B_86	Arcobacter nitrofigilis strain DSM 7299 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0,0	97%	NR_102873.1
O_B_87	Nitratireductor sp. CC-MHSW-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	EU564843.1
O_B_88	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_112716.1
O_B_89	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_9	Denitromonas indolicum strain MPKc 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	AY972852.1
O_B_90	Acidiphilium sybioticum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	AY632901.1
O_B_91	Bacteroides sp. SA-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	97%	AY695842.1
O_B_93	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_036801.1
O_B_94	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	NR_036801.1
O_B_95	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_96	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_036801.1
O_B_97	Clostridiales bacterium KM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	HM231145.1
O_B_98	Flavobacterium cucumis strain R2A45-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_044107.1

Tabla 10. Genoteca de las muestras SJP_INV_MA

SJP INV_MA	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
I_A_10	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_100	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	93%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_100	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	99%	0,0	97%	AB058905.1
I_A_101	Polaribacter sp. KJF11-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	87%	JQ800172.1
I_A_102	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	99%	0,0	97%	AB058905.1
I_A_103	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_104	Sulfitobacter sp. MBEF04 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB733554.1
I_A_105	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_106	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_107	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_112741.1
I_A_108	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	99%	0,0	97%	AB058905.1
I_A_109	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	94%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_11	Methylophaga thalassica strain YK-4015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	93%	NR_036802.1
I_A_110	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_111	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_112	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1
I_A_113	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_114	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_115	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	93%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_116	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_117	Frigoribacterium sp. MP161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	97%	JX067737.1
I_A_118	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_119	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_12	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_120	Alcanivorax sp. K3-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	92%	0,0	85%	AB055205.1
I_A_121	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ923436.1
I_A_122	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ923436.1
I_A_123	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	100 %	NR_112741.1
I_A_124	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_112741.1
I_A_125	Sulfitobacter sp. MBEF04 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB733554.1
I_A_126	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	93%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_127	Alcanivorax sp. K3-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	92%	0,0	85%	AB055205.1
I_A_128	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	94%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_129	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_13	Flavobacteria bacterium Ib002 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,95	0,0	99%	AB496641.1
I_A_130	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_131	Polaribacter sp. J15-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	HM010402.1
I_A_132	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_133	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1
I_A_134	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_135	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_136	Frigoribacterium sp. MP161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	98%	JX067737.1
I_A_137	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_138	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_114291.1
I_A_139	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_14	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_140	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_141	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1

I_A_142	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_143	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	97%	0,0	0,84	KF040403.1
I_A_144	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	99%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_145	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_146	Polaribacter sp. DOT-118-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	0,0	89%	AB711119.1
I_A_147	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_148	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_149	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_15	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_150	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_114291.1
I_A_151	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_152	Polaribacter sp. KJF12-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	JQ800202.1
I_A_153	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_112741.1
I_A_154	Flexibacter litoralis DSM 6794, complete genome	86%	0,0	69%	CP003345.1
I_A_154	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_16	MMarinomonassp. BSi20508 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU330335.1
I_A_17	Sulfitobacter sp. MBEF04 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB733554.1
I_A_18	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	95%	NR_036801.1
I_A_19	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_2	Frigoribacterium sp. MP161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	86%	JX067737.1
I_A_20	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_21	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	99%	DQ923436.1
I_A_22	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_23	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_24	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	DQ923436.1
I_A_25	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_114291.1
I_A_26	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_27	Marine bacterium HA-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	96%	HM100727.1
I_A_28	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_112741.1
I_A_29	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	DQ923436.1
I_A_3	Select seq gb AF376021.1 AF376021	92%	0,0	90%	AF376021.1
I_A_30	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence				
I_A_30	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_31	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_32	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_33	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_34	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_114291.1
I_A_35	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	94%	KF790925.1
I_A_36	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_37	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_112741.1
I_A_38	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	99%	0,0	95%	FR682100.2
I_A_39	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_4	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1
I_A_40	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	94%	0,0	96%	KF040403.1
I_A_41	Polaribacter sp. KJF12-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	JQ800202.1
I_A_42	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	97%	0,0	97%	KF040403.1
I_A_43	Marine bacterium HA-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,0	96%	HM100727.1
I_A_44	Belliella baltica DSM 15883, complete genome	89%	0,0	70%	CP003281.1
I_A_45	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1
I_A_46	MMarinomonassp. BSi20508 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	EU330335.1
I_A_47	Polaribacter sp. DOT-118-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	95%	0,0	89%	AB711119.1
I_A_48	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	96%	0,0	97%	KF040403.1

I_A_49	Polaribacter sp. J15-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	98%	HM010402.1
I_A_5	Flexibacter litoralis DSM 6794, complete genome	86%	0,0	69%	CP003345.1
I_A_50	Flavobacteria bacterium Ib002 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	95%	0,0	99%	AB496641.1
I_A_51	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	99%	0,0	97%	AB058905.1
I_A_52	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_53	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_53	Pseudomonas sp. J1-5-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	91%	KF135448.1
I_A_54	Polaribacter sp. KJF12-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	JQ800202.1
I_A_55	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	99%	0,0	98%	KF040403.1
I_A_56	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_57	Gamma proteobacterium Mo4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	93%	EU672862.1
I_A_58	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	95%	NR_036801.1
I_A_59	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_6	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,93	0,0	96%	AB496658.1
I_A_60	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0,0	95%	NR_036801.1
I_A_61	Frigoribacterium sp. MP161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	86%	JX067737.1
I_A_62	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	94%	NR_036801.1
I_A_63	Polaribacter sp. KJF12-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	JQ800202.1
I_A_64	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	95%	0,0	96%	KF040403.1
I_A_65	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_66	Polaribacter sp. DOT-118-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,97	0,0	89%	AB711119.1
I_A_67	Methylophaga sp. SM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0,0	87%	KF790925.1
I_A_68	Polaribacter sp. DOT-118-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	0,0	89%	AB711119.1
I_A_69	Polaribacter sp. W-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	DQ923436.1
I_A_7	Alcanivorax sp. K3-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	92%	0,0	85%	AB055205.1
I_A_70	Alcanivorax sp. K3-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	92%	0,0	85%	AB055205.1
I_A_71	Polaribacter sp. KJF11-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	87%	JQ800172.1
I_A_72	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	97%	0,0	95%	FR682100.2
I_A_73	Flavobacterium sp. 3034 partial 16S rRNA gene	99%	0,0	91%	AM110988.1
I_A_74	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_77	Sulfitobacter sp. MBEF04 gene for 16S rRNA, partial sequence	99%	0,0	99%	AB733554.1
I_A_78	Bacteroidetes bacterium SCGC AAA160-A21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	0,0	97%	JF488529.1
I_A_79	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_8	Siboglinum sp. associated bacterium partial 16S rRNA gene, clone W9_1	99%	0,0	94%	FR682100.2
I_A_82	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0,0	95%	NR_036801.1
I_A_83	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_84	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	93%	0,0	96%	AB496658.1
I_A_86	Marine bacterium HA-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	HM100727.1
I_A_88	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	100 %	NR_112741.1
I_A_9	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1
I_A_90	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_91	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112741.1
I_A_92	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	94%	NR_036801.1
I_A_95	Methylophaga nitratireducentescens strain JAM1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0,0	97%	NR_074321.1
I_A_96	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_116526.1

Tabla 11. Genoteca de las muestras SJP_INV_MB

SJP INV_MB	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
I_B_1	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	98%	AH001557
I_B_114	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	CP003380.1
I_B_115	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AH001560.2
I_B_117	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	97%	AH001557
I_B_16	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_18	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	96%	NR_112741.1
I_B_2	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	87%	AF376026
I_B_21	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001560.2

I_B_22	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	97%	KC121364
I_B_28	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001557
I_B_29	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_3	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0	99%	NR_025851
I_B_30	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001560.2
I_B_32	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	CP003380.1
I_B_34	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001557
I_B_36	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	71%	AF376026
I_B_37	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	AF376026
I_B_38	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_41	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	97%	AH001560.2
I_B_42	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_48	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	NR_112741.1
I_B_50	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	93%	0	97%	NR_025851
I_B_51	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001561.2
I_B_52	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98%	AH001560.2
I_B_53	Arcobacter cryaerophilus strain A 169/B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	L14624.1
I_B_55	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AF376026
I_B_58	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001560.2
I_B_62	Methylococcium alcaliphilum strain 20Z 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	88%	AF096091.1
I_B_64	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_65	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_67	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001557
I_B_68	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AF376021.1
I_B_70	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001560.2
I_B_72	Pseudomonas sp. G2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AF326356.1
I_B_1	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	98%	AH001557
I_B_114	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	CP003380.1
I_B_115	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AH001560.2
I_B_117	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	97%	AH001557
I_B_16	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_18	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	96%	NR_112741.1
I_B_2	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	87%	AF376026
I_B_21	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001560.2
I_B_22	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	97%	KC121364
I_B_28	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001557
I_B_29	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_3	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0	99%	NR_025851
I_B_30	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001560.2
I_B_32	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	CP003380.1
I_B_34	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001557
I_B_36	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	71%	AF376026
I_B_37	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	AF376026
I_B_38	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_41	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	97%	AH001560.2
I_B_42	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_48	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	NR_112741.1
I_B_50	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	93%	0	97%	NR_025851
I_B_51	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001561.2
I_B_52	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98%	AH001560.2
I_B_53	Arcobacter cryaerophilus strain A 169/B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	L14624.1
I_B_55	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AF376026
I_B_58	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001560.2
I_B_62	Methylococcium alcaliphilum strain 20Z 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	88%	AF096091.1
I_B_64	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_65	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_67	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001557
I_B_68	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AF376021.1
I_B_70	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001560.2
I_B_72	Pseudomonas sp. G2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AF326356.1
I_B_1	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	98%	AH001557
I_B_114	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	CP003380.1
I_B_115	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AH001560.2

I_B_117	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	97%	AH001557
I_B_16	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_18	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	96%	NR_112741.1
I_B_2	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	87%	AF376026
I_B_21	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001560.2
I_B_22	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	97%	KC121364
I_B_28	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001557
I_B_29	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_3	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	99%	0	99%	NR_025851
I_B_30	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001560.2
I_B_32	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	CP003380.1
I_B_34	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	99%	AH001557
I_B_36	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0	71%	AF376026
I_B_37	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	AF376026
I_B_38	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001560.2
I_B_41	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	97%	AH001560.2
I_B_42	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_48	Limnobacter litoralis strain KP1-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	NR_112741.1
I_B_50	Acidiphilium cryptum JF-5 strain JF-5 16S ribosomal RNA, complete sequence	93%	0	97%	NR_025851
I_B_51	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	92%	AH001561.2
I_B_52	Acidiphilium rubrum strain Colony15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98%	AH001560.2
I_B_53	Arcobacter cryaerophilus strain A 169/B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	98%	L14624.1
I_B_55	Acidiphilium sp. NO-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	91%	AF376026
I_B_58	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001560.2
I_B_62	Methylomicrobium alcaliphilum strain 20Z 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	88%	AF096091.1
I_B_64	Acidiphilium sp. ML2-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AH001561.2
I_B_65	Arcobacter cryaerophilus 16S ribosomal RNA	98%	0	99%	KC121364
I_B_67	Acidiphilium angustum strain KLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AH001557
I_B_68	Acidocella sp. NO-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	AF376021.1
I_B_70	Acidiphilium rubrum strain OP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	99%	AH001560.2
I_B_72	Pseudomonas sp. G2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	89%	AF326356.1

Tabla 12. Genoteca de las muestras SJP_MM

SJP MM	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
M_10	Rhodomonas salina strain CCMP1319 chloroplast, complete genome	99%	0,0	97%	EF508371.1
M_11	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	KC160733.1
M_13	Neptuniibacter caesariensis strain MED92 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	99%	NR_042749.1
M_14	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	98%	NR_036801.1
M_16	Amphora sp. C10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	98%	0,0	99%	FJ002217.1
M_17	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0,0	97%	KC160733.1
M_2	Neptuniibacter caesariensis strain MED92 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%	0,0	98%	NR_042749.1
M_20	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KC160733.1
M_21	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	HQ652551.1
M_22	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KM117233.1
M_23	Neptuniibacter caesariensis strain MED92 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_042749.1
M_24	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	KC160733.1
M_26	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_112716.1
M_27	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KM117233.1
M_28	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_036801.1
M_31	Micromonas pusilla plastid 16S rRNA gene (partial), ITS1, tRNA-Ile gene, tRNA-Ala gene and 23S rRNA gene (partial), strain M1681	98%	0,0	99%	FN563097.1
M_32	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	KC160733.1
M_33	Marinobacterium sp. Gal22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	KJ021872.1
M_35	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_112716.1
M_37	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	NR_036801.1
M_38	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KC160733.1
M_4	Neptuniibacter caesariensis strain MED92 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%	0,0	98%	NR_042749.1

M_40	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	97%	KC160733.1
M_41	Gamma proteobacterium SCGC AAA160-L02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	JF488585.1
M_43	Aureimarina marisflavi strain IMCC3054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	EF108215.1
M_44	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	HQ652551.1
M_46	Neptuniibacter caesariensis strain MED92 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0,0	98%	NR_042749.1
M_49	Marinobacterium sp. Gal22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	97%	KJ021872.1
M_5	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	KC160733.1
M_50	Aureimarina marisflavi strain IMCC3054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	EF108215.1
M_52	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KF804091.1
M_54	Acidocella aluminidurans strain AL46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_112716.1
M_55	Methylophaga nitratireducenticrescens strain JAM1, complete genome	97%	0,0	99%	CP003390.1
M_56	Gamma proteobacterium SCGC AAA160-L02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	JF488585.1
M_57	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	KC160733.1
M_58	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,91	0,0	96%	KM117233.1
M_6	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	HQ652551.1
M_60	Rhodobacter sp. WS63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,6	0,0	97%	KF804091.1
M_61	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KM117233.1
M_62	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
M_64	Marinobacterium sp. Gal22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KJ021872.1
M_68	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KC160733.1
M_69	Methylophaga nitratireducenticrescens strain JAM1, complete genome	99%	0,0	97%	CP003390.1
M_72	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	KC160733.1
M_74	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	98%	KM117233.1
M_75	Aureimarina marisflavi strain IMCC3054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	EF108215.1
M_8	Methylophaga nitratireducenticrescens strain JAM1, complete genome	98%	0,0	97%	CP003390.1
M_80	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	NR_036801.1
M_81	Flavobacterium sp. SS11.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KC160733.1
M_83	Haliaea sp. SM1351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	KM117233.1
M_9	Marinobacterium sp. Gal22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	KJ021872.1

Tabla 13. Genoteca de las muestras RAB_PRIM

RAB PRIM	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
P_1	Haliaceae bacterium LSUCC0247 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	76%	0	95%	KU382425.1
P_13	Pseudomonas syringae pv. theae strain KIWI-MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	93%	JQ317219.1
P_17	Flavobacteria bacterium Yb008 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0	99%	AB496663.1
P_2	Sulfitobacter sp. NSA_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	0	95%	KP204143.1
P_21	Sulfitobacter sp. SCS50m-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	87%	JX533673.1
P_24	Flavobacterium sp. V4.MS.25 partial 16S rRNA gene	99%	0	92%	AJ244702.1
P_26	Porticoccus litoralis strain NBRC 102686 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	56%	0	94%	NR_114179.1
P_27	Shewanella aestuarii strain SC18 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0	98%	NR_135728.1
P_27	Shewanella livingstonensis strain KOPRI_22225 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0	98%	EU000239.1
P_28	Sulfitobacter sp. NSA_11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	76%	0	94%	KP204143.1
P_29	Sulfitobacter sp. SCS50m-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	85%	JX533673.1
P_30	Robiginitalea sp. ZH09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0	94%	FJ872534.1
P_31	Flavobacteria bacterium Ib002 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	79%	0	90%	AB496641.1
P_33	Loktanella sp. strain 231_35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98%	KY363625.1
P_34	Roseobacter litoralis strain Och 149 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0	97%	NR_074143.1
P_37	Halioglobus japonicus strain NBRC 107739, complete genome	97%	0	95%	CP019450.1
P_38	Marinobacterium mangrovicola strain Gal22 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	0	90%	NR_134077.1
P_339	Gamma proteobacterium IMCC15037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	99%	JX439428.1
P_40	Winogradskyella sp. AHO9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0	84%	KT121446.1
P_43	Meridianimaribacter sp. ZJ6316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	86%	0	91%	KP301117.1
P_46	Meridianimaribacter sp. ZJ6316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	91%	KP301117.1
P_49	Rhodospirillaceae bacterium HSF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	0	92%	KP976094.1
P_50	Neptunomonas japonica strain DL5-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	87%	KF146511.1

P_51	Gammaproteobacteria bacterium LSUCC0272 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0	98%	KU382438.1
P_53	Gammaproteobacteria bacterium LSUCC0264 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0	99%	KU382433.1
P_54	Oceanibaculum pacificum strain MC2UP-L3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	88%	NR_116679.1
P_56	Gilvibacter sp. SZ-19 genome	84%	0	92%	CP019333.1
P_58	Gilvibacter sp. SZ-19 genome	100%	0	92%	CP019333.1
P_61	Halioglobus pacificus strain S1-72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0	94%	NR_113279.1
P_63	Luminiphilus syltensis strain Ivo14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	95%	NR_125526.1
P_65	Halieaceae bacterium LSUCC0247 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0	95%	KU382425.1
P_7	Oleiphilus messinensis strain ME102, complete genome	93%	0	97%	CP021425.1
P_70	Rhodobacter sp. SS12.40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0	98%	KC160928.1
P_79	Loktanelia sp. ZS2-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	0	97%	FJ195992.1

Tabla 14. Genoteca de las muestras RAB_VER

RAB VER	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
V_10	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	93%	0	99%	LT840186.1
V_11	Synechococcus sp. MA0607K 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence	94%	0	99%	FJ763779.1
V_12	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	80%	0	99%	LT840186.1
V_13	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	97%	0	99%	LT840186.1
V_14	Cytophaga fermentans strain ATCC 19072 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	72%	0	85%	NR_044696.1
V_16	Gilvibacter sp. SZ-19 genome	70%	0	97%	CP019333.1
V_16	Gilvibacter sp. SZ-19 genome	92%	0	97%	CP019333.1
V_16_	Microbulbifer thermotolerans strain DAU221, complete genome	95%	0	96%	CP014864.1
V_17	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	88%	0	99%	LT840186.1
V_17	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	74%	0	99%	LT840186.1
V_17_	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	95%	0	89%	LT840186.1
V_18	Tenacibaculum sp. KYW 576 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	0	97%	JQ687111.1
V_18	Tenacibaculum sp. MED341 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	99%	EU253574.1
V_18_	Lutibacter sp. LPB0138, complete genome	96%	0	97%	CP017478.1
V_2	Haliea sp. DSW4-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0	94%	HQ263241.1
V_20	Candidatus Aquiluna rubra strain HME8543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	99%	KC157039.1
V_21	Halotalea alkalilenta strain IHB B 13600, complete genome	93%	0	89%	CP015243.1
V_21	MMarinomonas blandensis strain MED 121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0	85%	DQ403809.1
V_21	Thiolapillus brandeum DNA, complete genome	96%	0	88%	AP012273.1
V_21_	Bacterium WHC3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	96%	JQ269279.1
V_22	Flavobacterium sp. strain UR11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	89%	KX244341.1
V_23	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	99%	0	99%	EU410957.1
V_24	MMarinomonas profundimaris strain 25BN12M-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0	89%	KC565667.2
V_28	Ralstonia mannitolilytica partial 16S rRNA gene, strain M17	100%	0	98%	LN890103.1
V_29	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0	99%	NR_116526.1
V_3	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	85%	0	97%	LT840186.1
V_33	Thalassobaculum salexigens strain CZ41_10a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69%	0	95%	NR_116122.1
V_34	Synechococcus sp. SAS15yc 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	63%	0	100%	KU925869.1
V_35	Candidatus Aquiluna rubra strain HME8543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	99%	KC157039.1
V_36	Arenibacter sp. strain R18H21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0	95%	KY810503.1
V_37	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	93%	0	100%	LT840186.1
V_38	Luminiphilus syltensis strain Ivo14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	92%	NR_125526.1
V_39	Sphingomonas japonica strain KC7 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	92%	0	92%	NR_041681.1
V_4	Aquibacter zeaxanthinifaciens strain CC-AMZ-304 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	0	93%	NR_125631.1
V_40	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	99%	0	100%	LT840186.1
V_41	Polaribacter sp. 7526 gene for 16S rRNA, partial sequence	90%	0	93%	AB498908.1

V_42	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	98%	0	97%	AP017315.1
V_44	Candidatus Aquiluna rubra 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0	98%	NR_125489.1
V_45	Candidatus Aquiluna rubra 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0	98%	NR_125489.1
V_46	Synechococcus sp. UBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0	99%	AF448063.1
V_48	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	97%	0	99%	EU410957.1
V_50	Robiginitalea biformata strain HTCC2501 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0	98%	NR_074601.1
V_53	Robiginitalea biformata HTCC2501, complete genome	98%	0	97%	CP001712.1
V_54	Synechococcus sp. MA0607K 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence; and tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence	99%	0	99%	FJ763779.1
V_55	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	100%	0	99%	LT840186.1
V_56	Aestuariivita boseongensis strain BS-B2 16S ribosomal RNA, partial sequence	90%	0	99%	NR_133957.1
V_57	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	99%	0	99%	LT840186.1
V_58	Aestuariivita boseongensis strain BS-B2 16S ribosomal RNA, partial sequence	90%	0	99%	NR_133957.1
V_59	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	91%	0	88%	AB058905.1
V_61	Synechococcus sp. UBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0	99%	AF448063.1
V_62	Micrococcus sp. SS13.21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	91%	KC160761.1
V_63	Synechococcus sp. WH8102 complete genome; segment 6/7	98%	0	98%	BX569694.1
V_65	Synechococcus sp. CSIRNIO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	71%	0	99%	KT180202.1
V_66	Pelagibaca sp. P9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0	98%	HM535637.1
V_67	Thalassococcus sp. MME-062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0	97%	KP410683.1
V_68	Mesorhizobium sp. NBIMC_P2 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	100%	0	95%	KF040403.1
V_7	Halieaceae bacterium LSUCC0045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	80%	0	99%	KU382361.1
V_72	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	99%	0	99%	LT840186.1
V_76	Synechococcus sp. CSIRNIO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	0	99%	KT180202.1
V_79	Synechococcus sp. CSIRNIO2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	0	99%	KT180202.1
V_8	Flavobacteriaceae bacterium D9 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	84%	0	89%	LC075351.1
V_9	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	87%	0	99%	LT840186.1

Tabla 15. Genoteca de las muestras RAB_OTO

RAB OTO	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
O_100	Aureivirga sp. CE83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	KT596063.1
O_101	Arcobacter sp. 4D4(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	GU186177.1
O_102	Legionella pneumophila subsp. pasculei strain D-7119, complete genome	98%	0,0	99%	CP014257.1
O_104	Legionella yabuuchiae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: OA1-3	97%	0,0	97%	AB233211.1
O_106	Francisella sp. CA97-1460, complete genome	98%	0,0	98%	CP009654.1
O_107	Rhodospirillum sp. 7M-Z19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0,0	97%	KX426600.1
O_109	Gamma proteobacterium SKA56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0,0	96%	AY317123.1
O_11	Magnetospira sp. QH-2 chromosome, complete genome	98%	0,0	97%	FO538765.1
O_110	Cytophagia bacterium IMCC14975 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0,0	98%	JX439384.1
O_111	Balneola vulgaris strain 13IX/A01/164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_042991.1
O_112	Gamma proteobacterium IMCC14602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	86%	0,0	99%	JX439096.1
O_113	Microbulbifer thermotolerans strain DAU221, complete genome	97%	0,0	97%	CP014864.1
O_115	Magnetospira sp. QH-2 chromosome, complete genome	99%	0,0	98%	FO538765.1
O_116	Bacterium WHC4-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	JQ269288.1
O_117	Thiohalobacter thiocyanaticus strain HRh1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	0,0	99%	NR_116699.1
O_118	Gamma proteobacterium SCGC AAA076-K13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	0,0	99%	JF488445.1
O_12	Bacterium WHC3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	JQ269279.1
O_121	Alkalimarinus sediminis strain FA028 16S ribosomal RNA, partial sequence	98%	0,0	99%	NR_137384.1
O_122	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	90%	0,0	100%	LT840186.1
O_124	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	94%	0,0	100%	EU410957.1
O_126	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	88%	0,0	99%	LT840186.1
O_127	Rubrivirga profundus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0,0	99%	KR108283.1
O_129	Rubrivirga profundus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	KR108283.1
O_130	Rubrivirga profundus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0,0	97%	KR108283.1
O_14	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	94%	0,0	98%	AB496658.1
O_15	Thiohalobacter thiocyanaticus strain HRh1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	99%	NR_116699.1
O_16	Pseudoruegeria aquimaris strain SW-255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	NR_043932.1
O_18	Rhodobacter sp. CR07-62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	86%	0,0	98%	EU979476.1

O_19	Bacillus sp. KP7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	KJ777140.1
O_2	Thalassolituus marinus strain IMCC1826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	97%	NR_108606.1
O_20	Thalassolituus marinus strain IMCC1883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	96%	HM569768.1
O_21	Thalassolituus marinus strain IMCC1883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0,0	97%	HM569768.1
O_23	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	90%	0,0	100%	EU410957.1
O_24	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	99%	LT840186.1
O_25	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	88%	0,0	99%	LT840186.1
O_26	Phaeobacter gallaeciensis strain JL2886, complete genome	94%	0,0	96%	CP015124.1
O_27	Sulfitobacter sp. AM1-D1 plasmid unnamed4, complete sequence	96%	0,0	98%	CP018080.1
O_3	Oceanicola marinus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: SI5	99%	0,0	98%	AB712336.1
O_30	Phaeobacter gallaeciensis strain JL2886, complete genome	94%	0,0	96%	CP015124.1
O_31	Oceanicola marinus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: SI5	86%	0,0	97%	AB712336.1
O_32	Sulfitobacter sp. AM1-D1 plasmid unnamed4, complete sequence	98%	0,0	98%	CP018080.1
O_33	Vibrio sp. V639 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0,0	99%	DQ146989.1
O_34	Bacterium IMCC8954 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	98%	KJ492212.1
O_35	Vibrio harveyi strain H053 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	98%	KJ577048.1
O_36	Luminiphilus syltensis strain Ivo14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_125526.1
O_37	Methylophilus methylotrophus gene for 16S rRNA	99%	0,0	98%	AB193724.1
O_38	Methylophilales bacterium MBRSG12 genome	97%	0,0	99%	CP011003.1
O_4	Methylophilales bacterium MBRSG12 genome	99%	0,0	99%	CP011003.1
O_40	Microbulbifer thermotolerans strain DAU221, complete genome	98%	0,0	97%	CP014864.1
O_41	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	95%	0,0	99%	EU410957.1
O_43	Alcanivorax sp. OM-2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	0,0	98%	AB053128.1
O_44	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	95%	0,0	99%	LT840186.1
O_46	Rhodopseudomonas sp. P530(9) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	99%	GU370102.2
O_47	Candidatus Pelagibacter sp. AAA797-I19 partial 16S rRNA gene	95%	0,0	99%	LN850161.1
O_48	Luminiphilus syltensis strain Ivo14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	NR_125526.1
O_5	Pseudomonas stutzeri partial 16S rRNA gene, strain L65	98%	0,0	97%	LN890061.1
O_50	Marinobacterium litorale strain IMCC1877 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	98%	NR_044016.1
O_51	Halieaceae bacterium LSUCC0247 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	0,0	97%	KU382425.1
O_52	Microbulbifer thermotolerans strain DAU221, complete genome	98%	0,0	97%	CP014864.1
O_53	Luminiphilus syltensis strain Ivo14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	NR_125526.1
O_54	Desulfobacter curvatus strain DSM 3379 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	NR_041851.1
O_56	Desulfobacter hydrogenophilus strain DSM 3380 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	0,0	98%	AM774316.1
O_57	Desulfobacter curvatus strain DSM 3379 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	NR_041851.1
O_58	Candidatus Aquiluna rubra strain HME8543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KC157039.1
O_59	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	97%	LT627734.1
O_6	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	86%	0,0	99%	LT840186.1
O_60	Tistrella bauzanensis strain BZ78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	98%	NR_117256.1
O_61	Pseudomonas sp. S-6-2, complete genome	95%	0,0	97%	CP020100.1
O_62	Lutibaculum sp. strain B15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	KX989462.1
O_64	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	88%	0,0	99%	LT840186.1
O_65	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	92%	0,0	99%	LT840186.1
O_66	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	99%	EU410957.1
O_67	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	99%	0,0	99%	AB058905.1
O_68	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	85%	0,0	96%	AB496658.1
O_69	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	98%	0,0	99%	AB058905.1
O_7	Flavobacteria bacterium Yb008 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	58%	0,0	98%	AB496663.1
O_71	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	72%	0,0	98%	AB496658.1
O_73	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	72%	0,0	98%	AB496658.1
O_74	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	88%	0,0	99%	LT840186.1
O_75	Candidatus Pelagibacter sp. AAA795-C10 partial 16S rRNA gene	90%	0,0	99%	LN850145.1
O_76	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	96%	0,0	99%	LT840186.1
O_78	Thalassococcus sp. NAP41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	99%	KP272157.2
O_79	Rhodobacterales bacterium CB1049 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	97%	FJ869046.1
O_80	Ruegeria sp. JZ08IS47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0,0	97%	KC429799.1
O_82	Marinobacter lutaoensis strain T5054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	NR_025116.1
O_83	Pararhodobacter sp. M90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	98%	KM186167.1
O_85	Marinobacter sp. HMF2338 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	KJ728852.1
O_86	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	97%	LT627734.1
O_87	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	72%	0,0	97%	AB496658.1
O_88	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	97%	LT627734.1
O_9	Flexibacter aggregans gene for 16S rRNA, strain: IFO 15974	97%	0,0	97%	AY258118.1

O_90	Marinoscillum luteum strain SJP7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	99%	NR_108992.1
O_91	Roseivirga sp. F8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0,0	97%	EU697080.1

Tabla 16. Genoteca de las muestras RAB_INV

RAB INV	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
I_1	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	99%	HQ652551.1
I_10	Glaciecola sp. NF1-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0,0	97%	FJ196025.1
I_11	Polaribacter sp. K20-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0,0	99%	HM010403.1
I_12	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	95%	0,0	97%	AP017315.1
I_13	Sulfotobacter sp. RO2 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	98%	0,0	99%	AB607862.1
I_14	Flexibacter sp. IUB42 gene for 16S rRNA	94%	0,0	97%	AB058905.1
I_16	Verrucomicrobia bacterium PAORIC-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	94%	KP030836.1
I_17	Candidatus Jidaibacter acanthamoeba 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0,0	99%	AF069962.1
I_18	Candidatus Jidaibacter acanthamoeba 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	97%	AF069962.1
I_21	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	97%	0,0	97%	AP017315.1
I_22	Phycisphaera mikurensis strain NBRC 102666 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%	0,0	99%	NR_074491.1
I_23	Planctomycete GMD14H07 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	97%	AY162124.1
I_25	Methylophilaceae bacterium NB0070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0,0	97%	KP770084.1
I_27	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	96%	0,0	97%	AP017315.1
I_28	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	0,0	98%	HQ652551.1
I_29	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	97%	0,0	97%	AP017315.1
I_3	Marinobacterium sp. F19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	98%	GU082333.1
I_30	Meridianimaribacter sp. ZJ6316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0,0	98%	KP301117.1
I_31	Maribacter sp. T28, complete genome	95%	0,0	99%	CP018760.1
I_33	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0,0	98%	NR_036801.1
I_34	Methylophaga marina strain 222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	97%	NR_036801.1
I_35	Limnobacter thiooxidans strain TSWCSN35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	0,0	98%	GQ284439.1
I_36	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	87%	0,0	98%	AB496658.1
I_37	Sphingobacteria bacterium SKA51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	99%	AY317118.1
I_38	Marinobacterium mangrovicola strain Gal22 16S ribosomal RNA, partial sequence	94%	0,0	99%	NR_134077.1
I_39	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	96%	0,0	97%	AP017315.1
I_41	Haliae atlantica strain SM1351 16S ribosomal RNA, partial sequence	90%	0,0	97%	NR_137377.1
I_42	Chryseoglobus sp. strain IHBB 9314 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	98%	KU921548.1
I_43	Methylophaga nitratireducens strain JAM1, complete genome	90%	0,0	97%	CP003390.2
I_44	Rhodospirillaceae bacterium HSF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	97%	KP976094.1
I_46	Methylobacillus flagellatus strain KT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0,0	99%	KP770103.1
I_47	Flavobacterium sp. V4.BS.09 partial 16S rRNA gene, marine isolate	91%	0,0	98%	AJ244698.1
I_48	Aggregatibacter segnis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0,0	99%	AF224299.1
I_49	Arenibacter nanhaiticus strain NH36A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0,0	99%	NR_116526.1
I_5	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	92%	0,0	97%	AP017315.1
I_50	Arcobacter sp. ONE-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0,0	97%	KF650753.1

Tabla 17. Genoteca de las muestras RAB_MM

RAB MM	Max Similitud	C	e	% S.	Nº acceso
Clon					
M_1	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	99%	0,0	97%	AM999978.1
M_10	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	99%	0,0	99%	LT840186.1
M_11	Hoeflea sp. MA 7-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	99%	EU410957.1
M_13	Hoeflea sp. AY-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	98%	GQ365715.1
M_15	Flavobacteriaceae bacterium strain AU392 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	98%	AE017282.2
M_16	Methylococcus capsulatus str. Bath, complete genome	100%	0,0	99%	AB496658.1
M_18	Flavobacterium sp. SCGC AAA298-K20 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	AB610889.1
M_20	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	98%	0,0	97%	CP002542.1
M_21	Microcella sp. p7(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	97%	AP017315.1
M_23	Candidatus Aquiluna rubra strain HME8543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0,0	97%	LT840186.1

M_24	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	97%	LT627734.1
M_25	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	96%	0,0	97%	LT627734.1
M_26	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	98%	LT840186.1
M_27	Flavobacteria bacterium Ib002 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	98%	0,0	99%	LT840186.1
				100	
M_29	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	98%		%	FJ460069.1
M_3	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	99%	KU382423.1
M_30	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	99%	LT840186.1
				100	
M_31	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	%	EU410957.1
M_33	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	97%	LT627734.1
M_34	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	97%	LT627734.1
M_35	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	98%	0,0	98%	LT840186.1
M_36	Proteobacterium MS-F-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0,0	99%	LT840186.1
M_37	Pelagibacterales bacterium LSUCC0245 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0,0	99%	AB496658.1
M_38	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	99%	JF488471.1
M_39	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	97%	LT627734.1
M_40	Methylococcus capsulatus str. Bath, complete genome	98%	0,0	97%	AB496658.1
M_42	Candidatus Pelagibacter sp. HIMB1321 genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	98%	AE017282.2
M_43	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid 01-003783, complete sequence	96%	0,0	97%	EU410957.1
M_45	Candidatus Aquiluna rubra partial 16S rRNA gene, strain MWH-BeijK2	97%	0,0	97%	NR_125490.1
M_47	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	97%	0,0	97%	AM999978.1
M_48	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	98%	0,0	97%	LT627734.1
M_49	Candidatus Rhodoluna limnophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0,0	97%	LT627734.1
M_50	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	97%	0,0	98%	AB496641.1
M_51	Microcella alkaliphila DNA, complete genome, strain: JAM AC0309	98%	0,0	97%	AP017315.1
M_52	Candidatus Aquiluna rubra partial 16S rRNA gene, strain MWH-BeijK2	95%	0,0	98%	HQ652551.1
M_53	Candidatus Aquiluna sp. UB-MaderosW2red genome assembly, chromosome: I	0,91	0,0	97%	KC157039.1
M_54	Flavobacteria bacterium Ib002 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	0,0	97%	LT627734.1
M_55	Flavobacteria bacterium Yb001 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,6	0,0	98%	AB496641.1
M_56	Fluviicola taffensis DSM 16823, complete genome	98%	0,0	98%	KX503310.1

ANEXO II

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS MICROALGAS

Figura 1. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Cd^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *Coelastrella* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *T. obliquus*. pH4; h) *T. obliquus* pH7. Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni.

● Control ● 0,35 mgL^{-1} ● 0,7 mgL^{-1} ● 1,4 mgL^{-1} ● 2,8 mgL^{-1} ● 5,6 mgL^{-1}

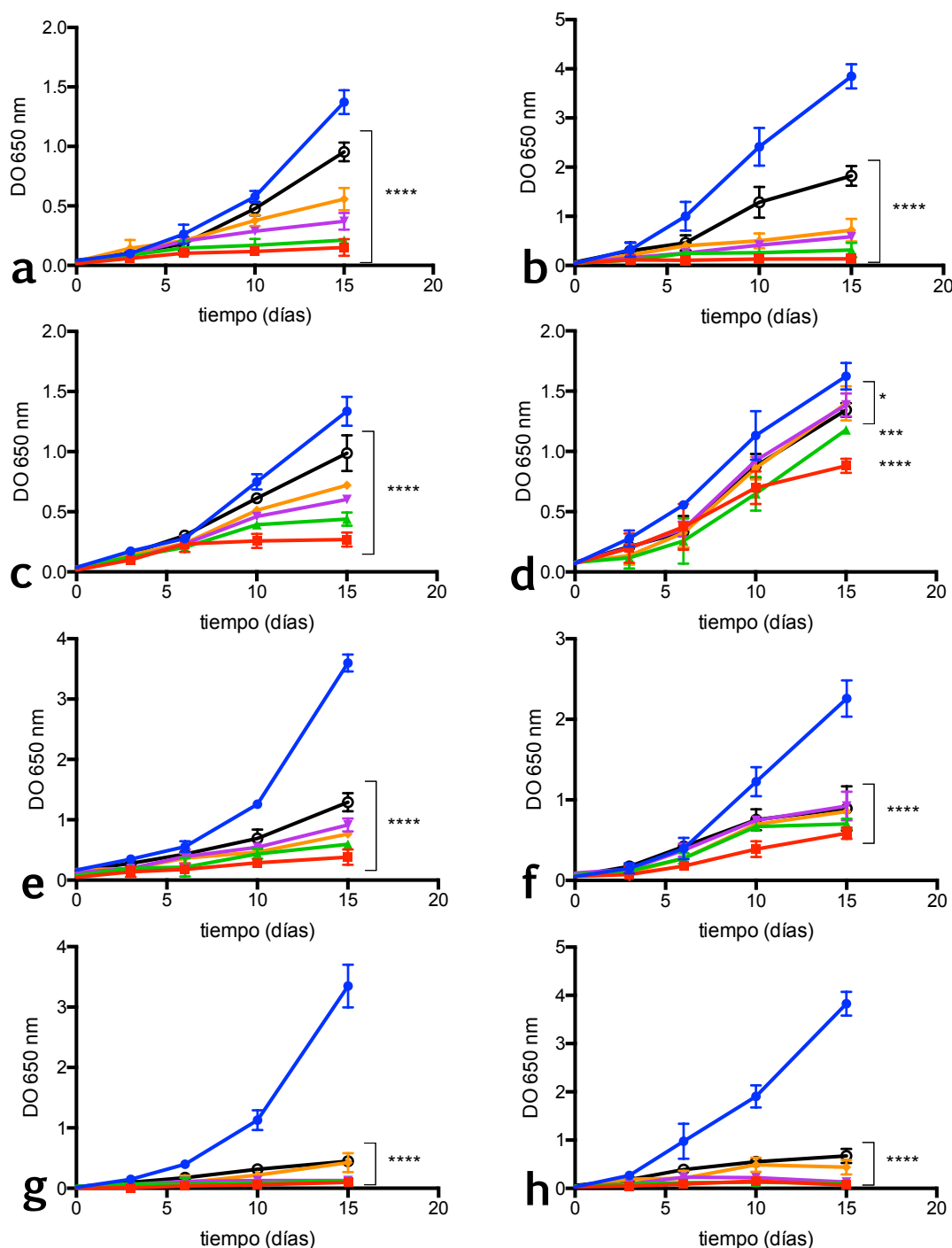
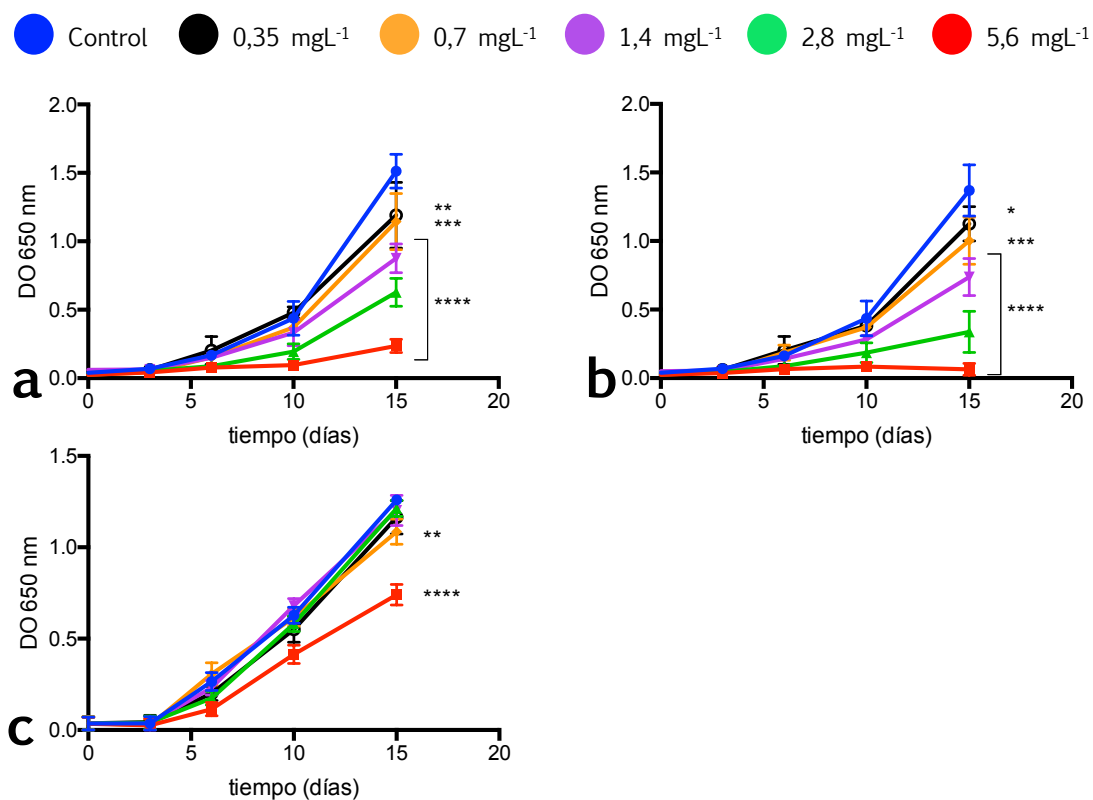


Figura 2. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Cd^{++} . a) *S. bacillaris* pH4; b) *S. bacillaris* pH7; c) *Porphyridium* sp.

Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni



ns = $p > 0,05$

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

**** = $p \leq 0,0001$

Figura 3. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Cu^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *Coelastrella* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *T. obliquus* pH4; h) *T. obliquus* pH7. Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni

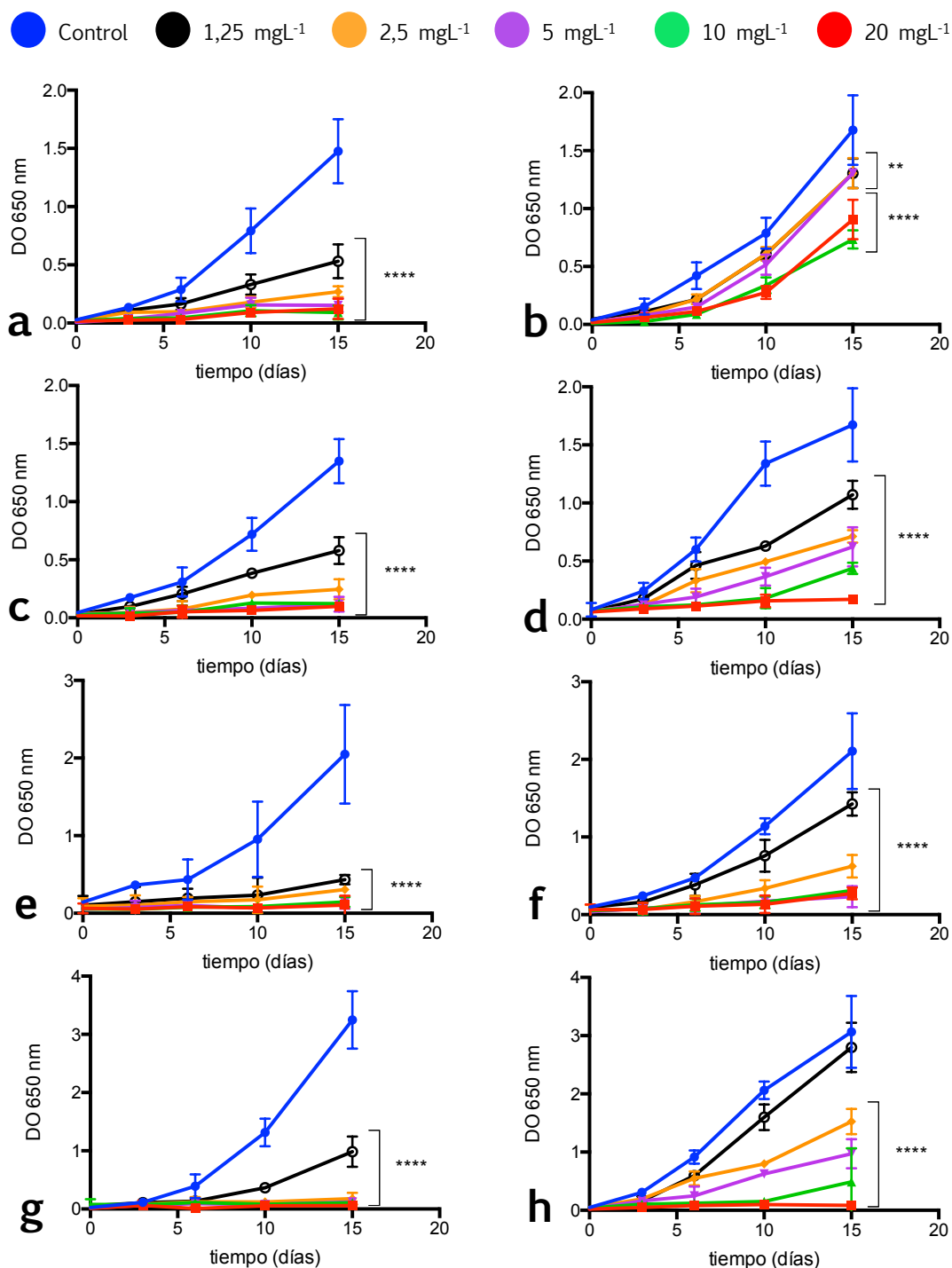
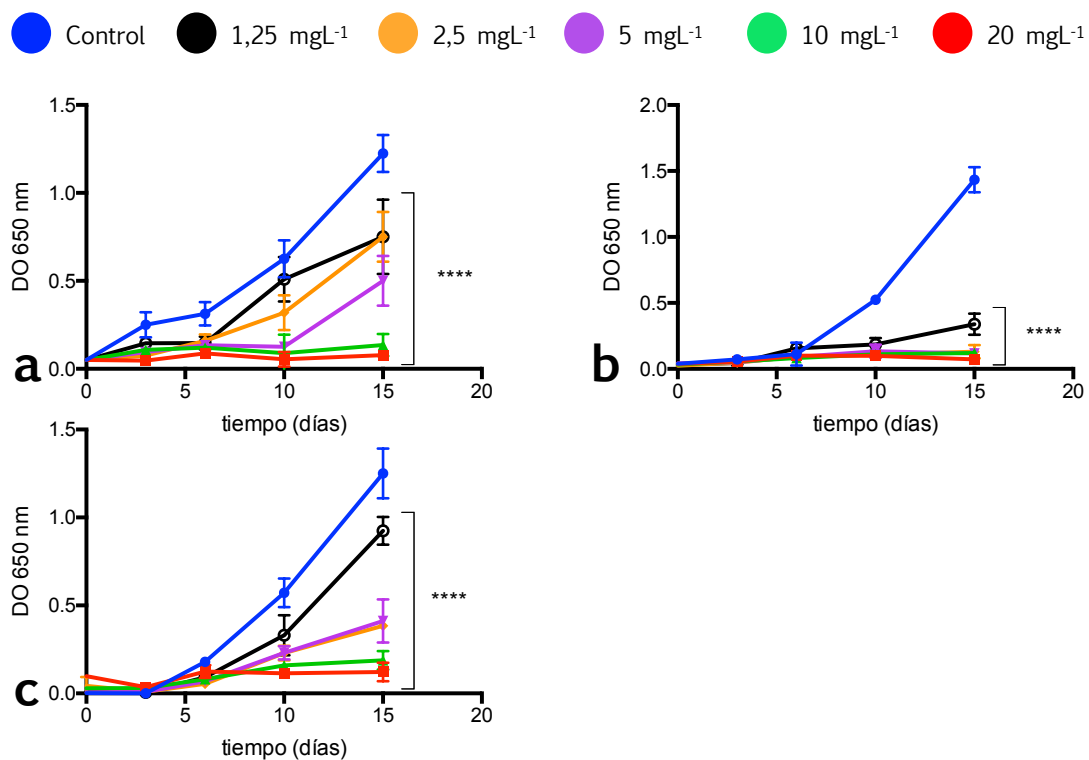


Figura 4. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Cd^{++} . a) *S. bacillaris* pH4; b) *S. bacillaris* pH7; c) *Porphyridium* sp.

Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni



ns = $p > 0,05$

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

**** = $p \leq 0,0001$

Figura 5. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Fe^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *Coelastrella* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *T. obliquus* pH4; h) *T. obliquus* pH7. Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni

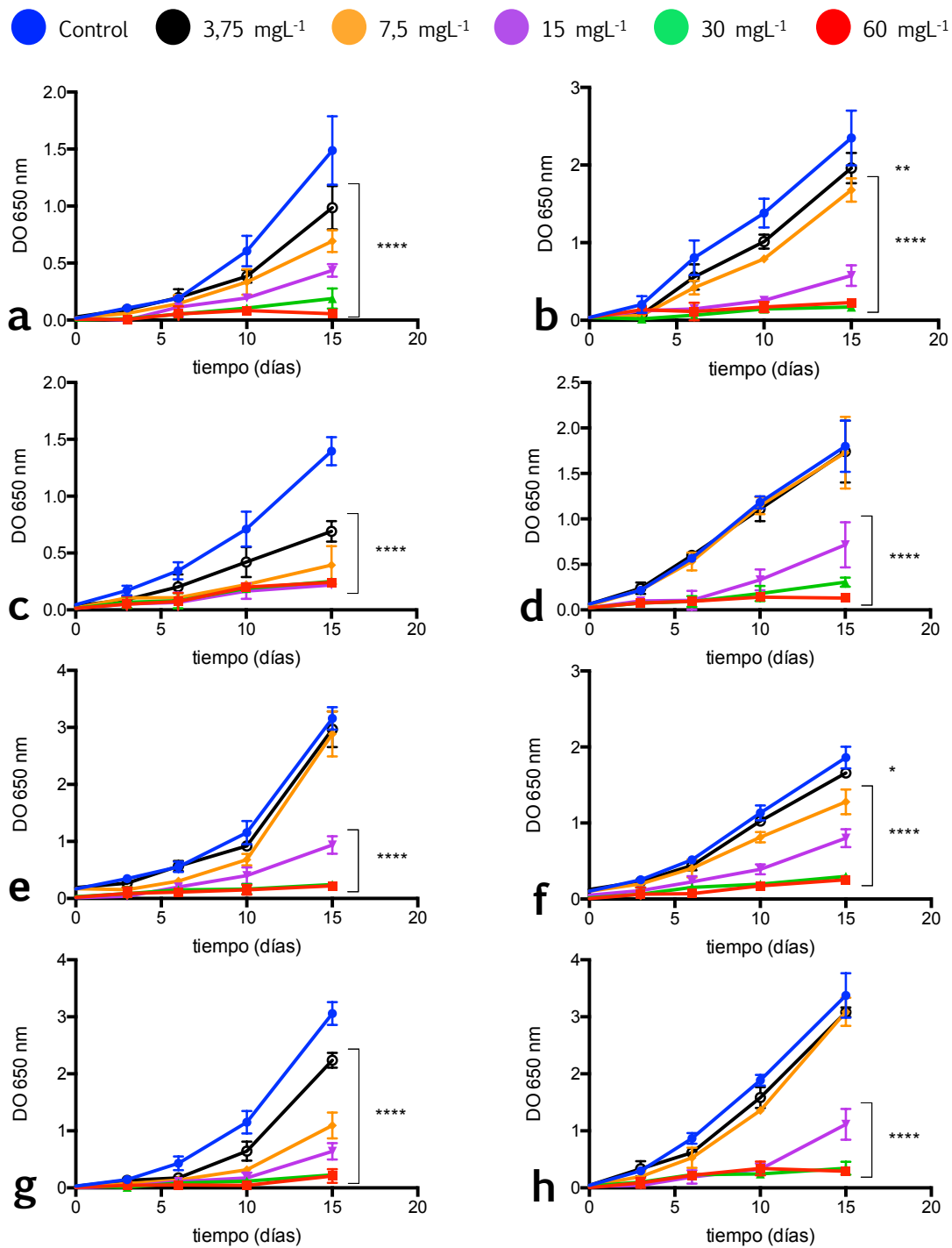
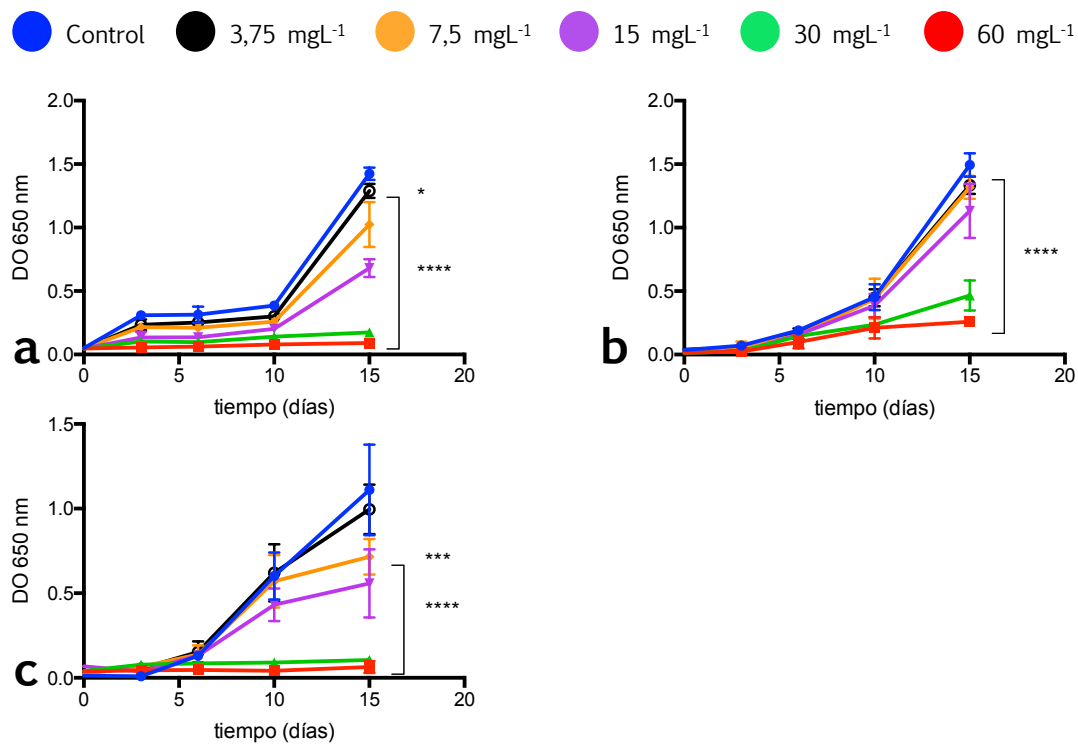


Figura 6. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Fe^{++} . a) *S. bacillaris* pH4; b) *S. bacillaris* pH7; c) *Porphyridium* sp.

Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni



ns = $p > 0,05$

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

**** = $p \leq 0,0001$

Figura 7. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Pb^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *Coelastrella* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *T. obliquus*. pH4; h) *T. obliquus* pH7. Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni

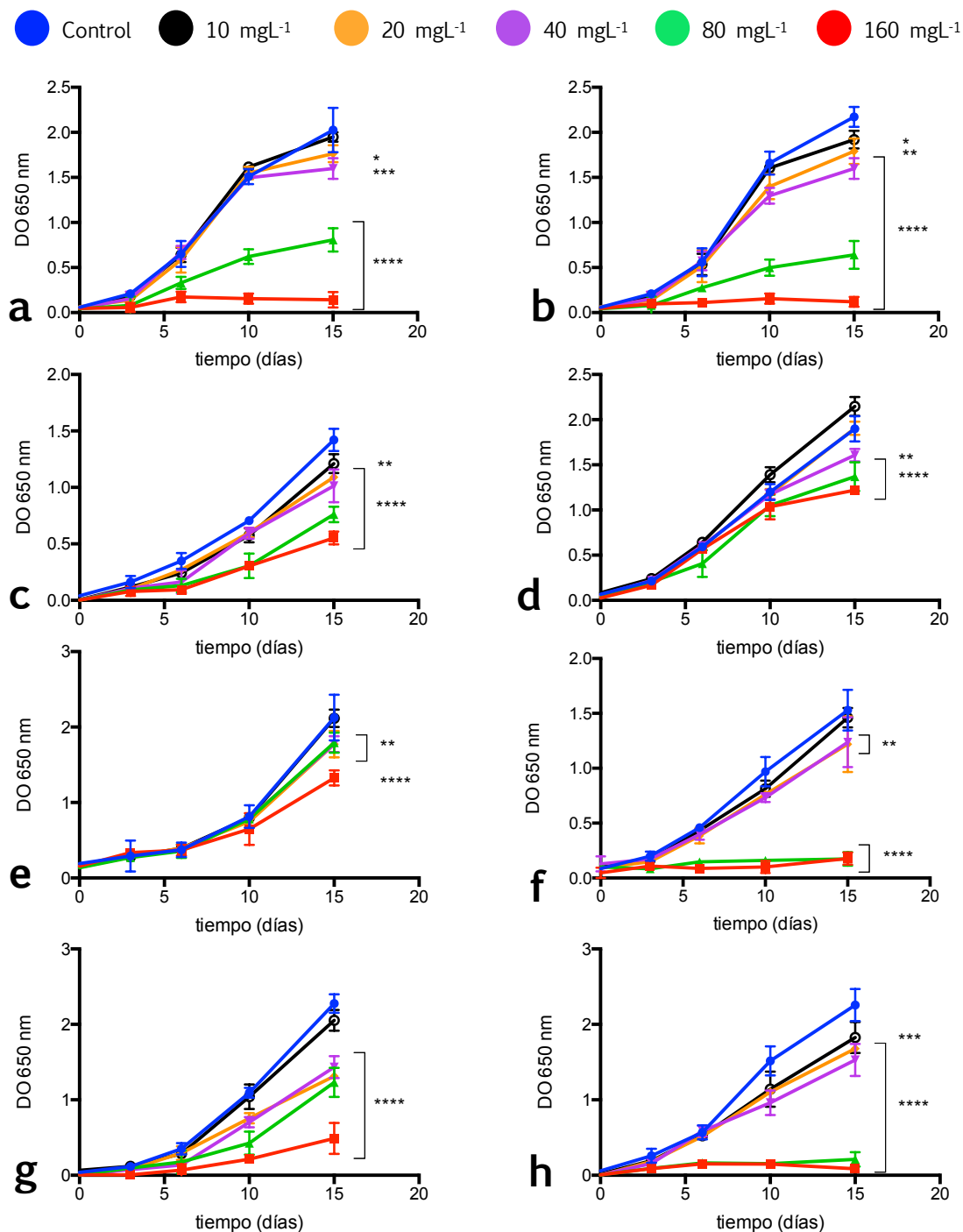
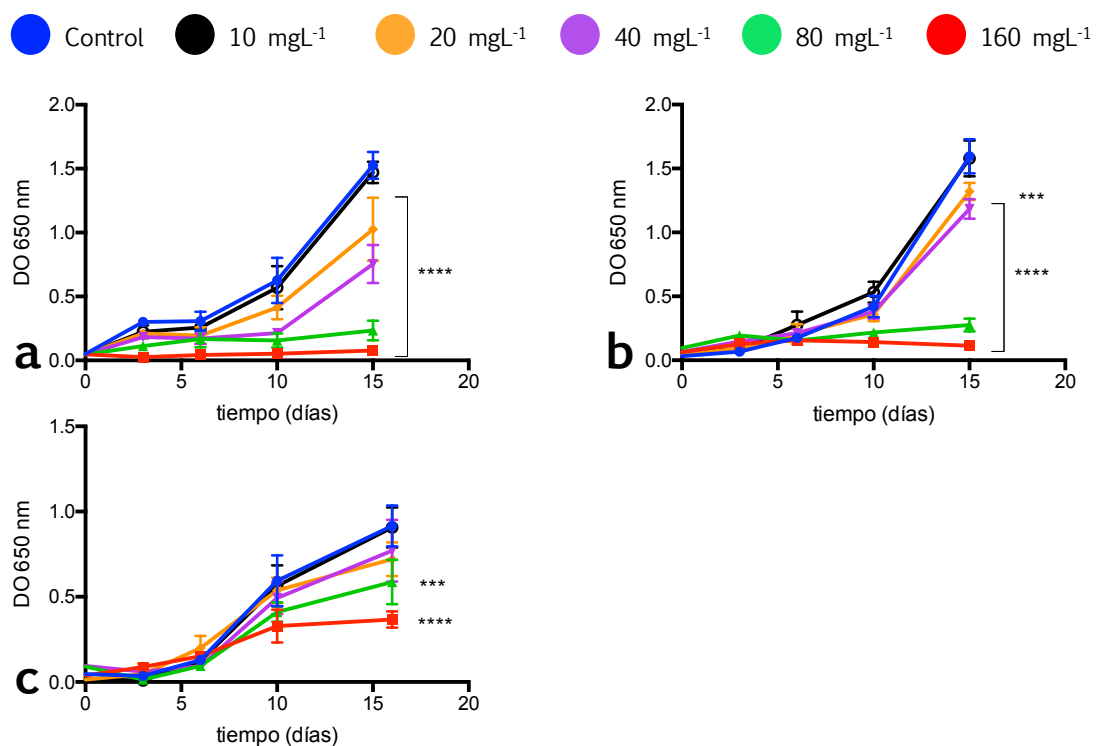


Figura 8. Curvas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a diferentes concentraciones de Pb^{++} . a) *S. bacillaris* pH4; b) *S. bacillaris* pH7; c) *Porphyridium* sp.

Los * indican el nivel de significación procedente del test de Bonferroni



ns = $p > 0,05$

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

**** = $p \leq 0,0001$

Figura 9. Frecuencia de los tamaños (diámetros) de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de Cd^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *T. obliquus* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *Coelastrella* sp. pH4; h) *Coelastrella* sp. pH7; i) *Porphyridium* sp.

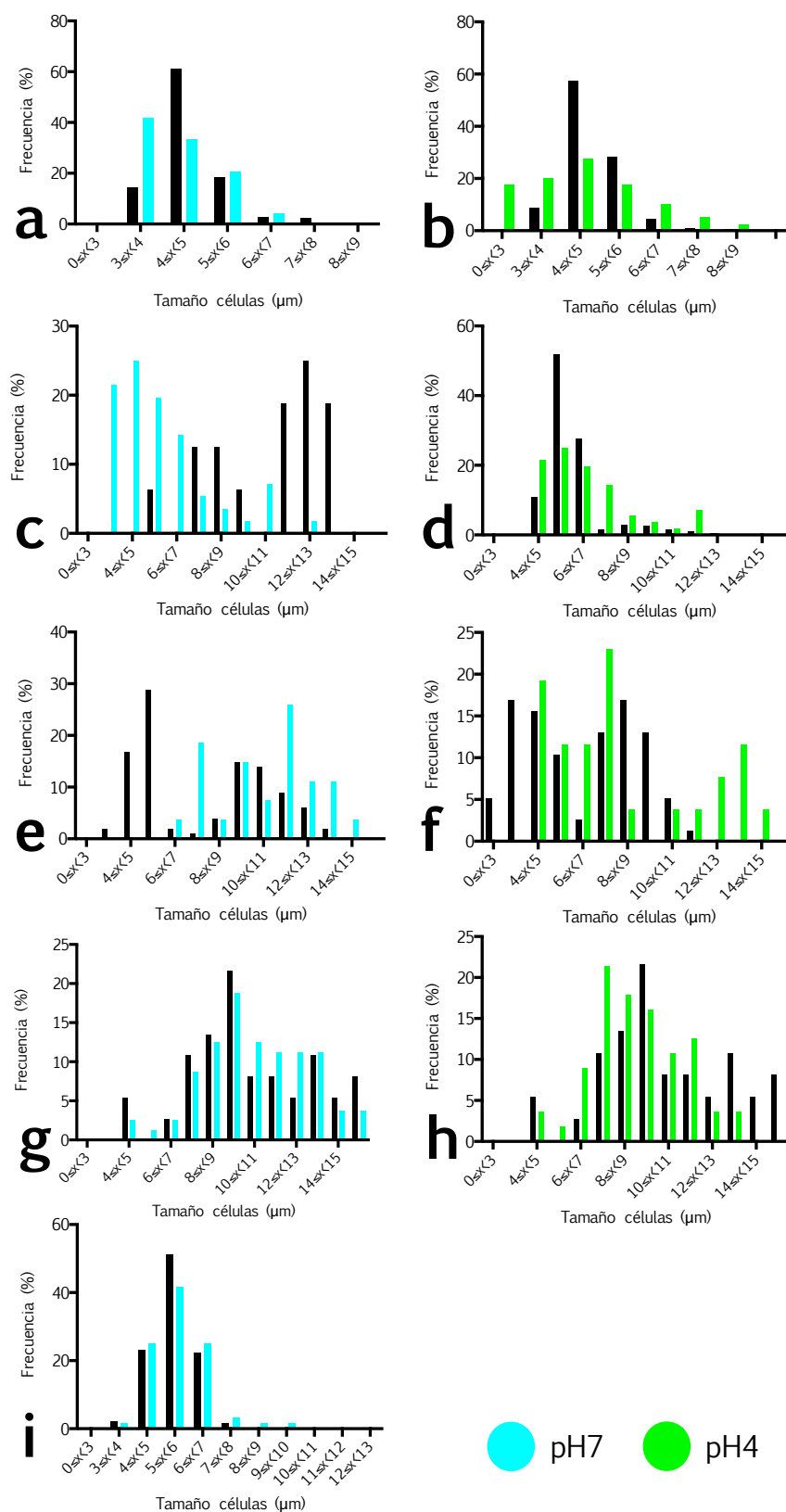


Figura 10. Frecuencia de los tamaños (diámetros) de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *T. obliquus* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *Coelastrella* sp. pH4; h) *Coelastrella* sp. pH7; i) *Porphyridium* sp.

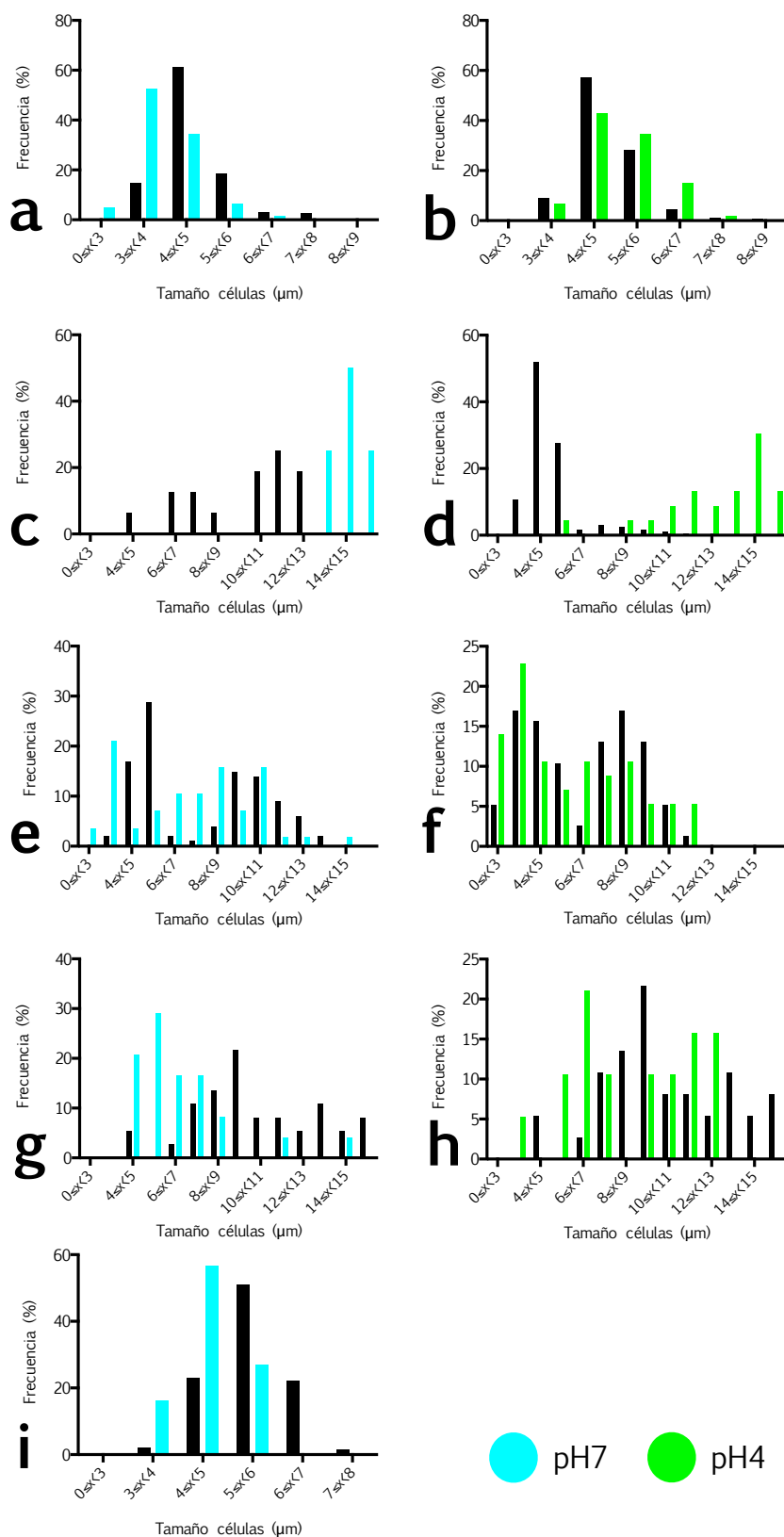


Figura 11. Frecuencia de los tamaños (diámetros) de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de Fe^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyaceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyaceae* sp. pH7; e) *T. obliquus* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *Coelastrella* sp. pH4; h) *Coelastrella* sp. pH7; i) *Porphyridium* sp.

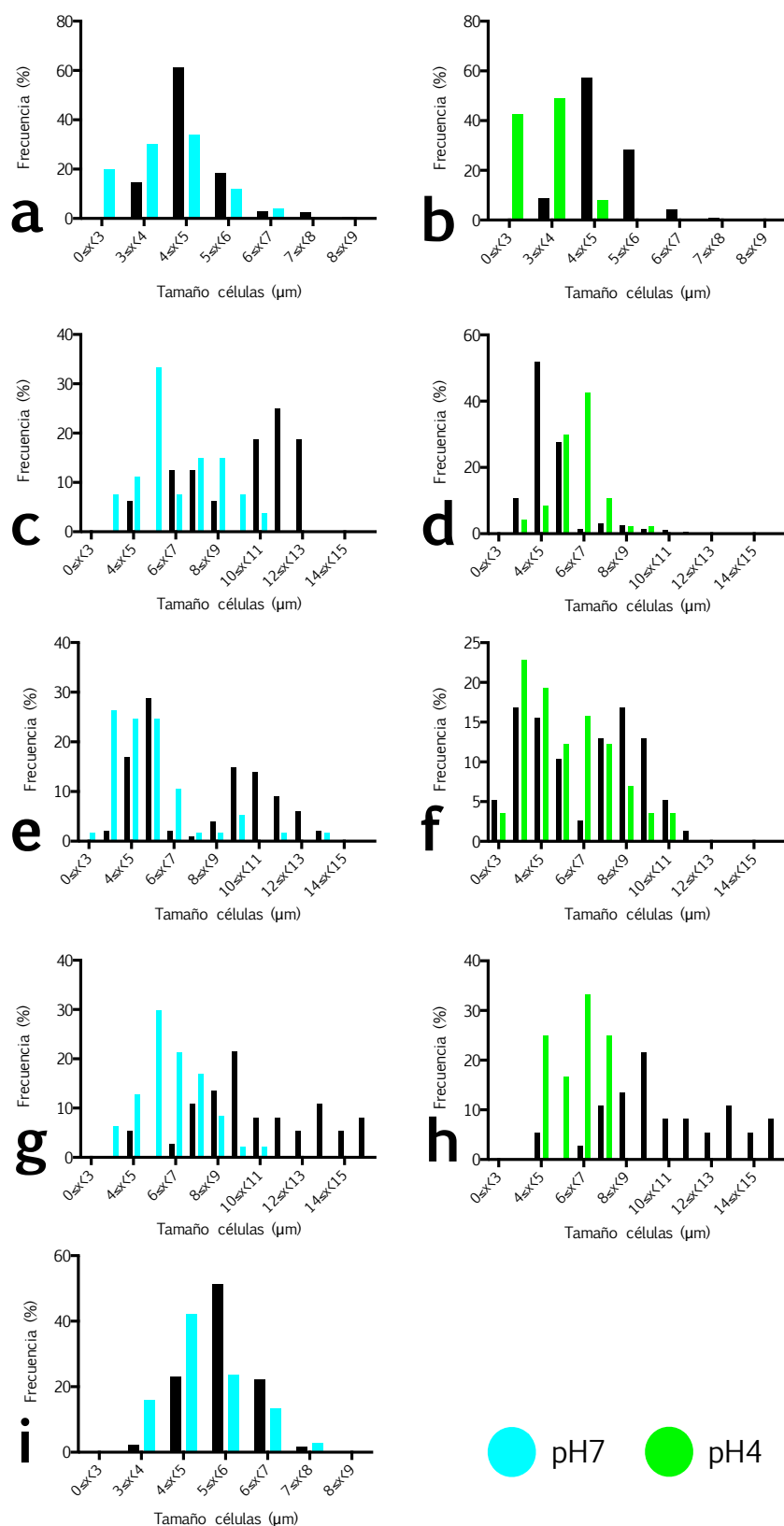


Figura 12. Frecuencia de los tamaños (diámetros) de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de Pb^{++} . a) *Parachlorella* sp. pH4; b) *Parachlorella* sp. pH7; c) *Trebouxiphyceae* sp. pH4; d) *Trebouxiphyceae* sp. pH7; e) *T. obliquus* pH4; f) *Coelastrella* sp. pH7; g) *Coelastrella* sp. pH4; h) *Coelastrella* sp. pH7; i) *Porphyridium* sp.

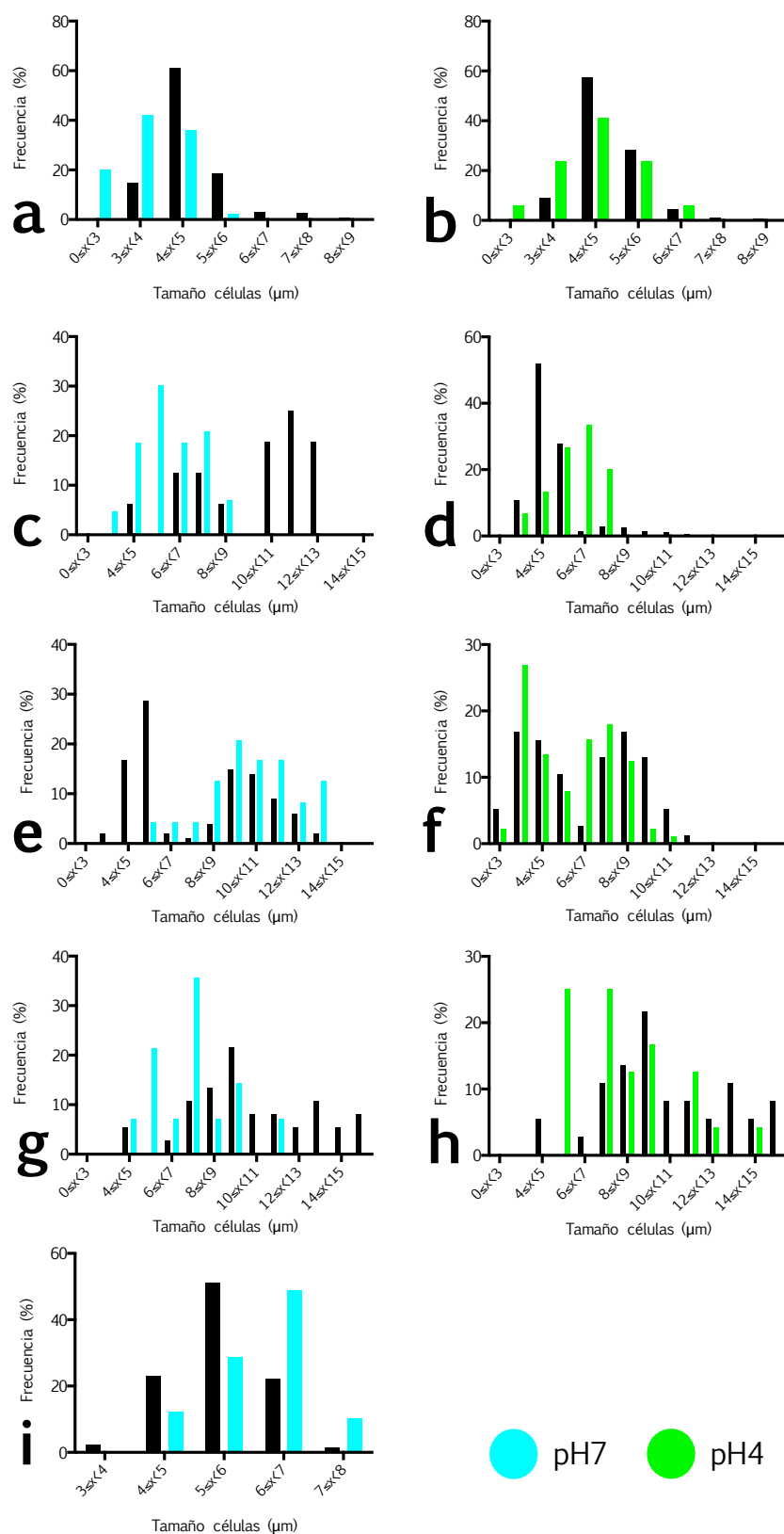


Figura 13. Gráfico de sedimentación de la PCA correspondiente al apartado 4.2.2.2.4, Fig. 61.

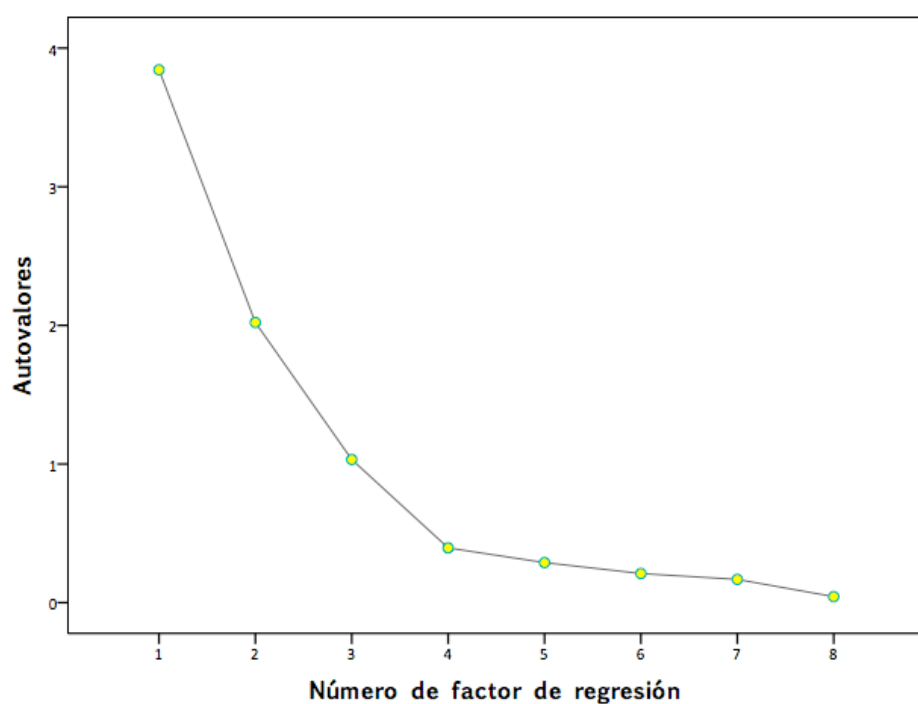


Tabla 1. Varianza total explicada de la PCA de las muestras a las que se refiere en el texto, apartado 4.2.2.2.4, Fig. 61.

FDR ¹³	Autovalores	% de la varianza	% acumulado
	iniciales		
1	3,876	43,066	43,066
2	2,028	22,535	65,601
3	1,146	12,736	78,337
4	0,887	9,852	88,188
5	0,386	4,293	92,481
6	0,279	3,097	95,578
7	0,209	2,326	97,904
8	0,15	1,666	99,57
9	0,039	0,43	100

¹³ FDR=Factor de Regresión

Tabla 2. Matriz de componentes de la PCA de las muestras a las que se refiere en el texto en el apartado 4.2.2.2.4, Fig. 61.

Matriz Componentes		
	1	2
λ máx	0,209	-0,12
t bajada	0,762	-0,454
tamaño	-0,653	0,607
PDI	0,301	0,217
TEM agregación	-0,692	0,579
IC ₅₀ <i>E. coli</i>	0,77	0,515
IC ₅₀ <i>K. pneumoniae</i>	0,691	0,629
IC ₅₀ <i>S. epidermidis</i>	0,74	0,593
t máx DO	0,799	-0,209
λ máx	0,209	-0,12
t bajada	0,762	-0,454
tamaño	-0,653	0,607

Tabla 3. Concentraciones utilizadas en el ensayo de Biorremediación a las que se refiere en el apartado 4.2.2.1.5

	pH	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)
<i>Parachlorella</i> sp.	7	10	15
<i>Parachlorella</i> sp.	4	1,25	15
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	7	5	60
<i>Trebouxiophyceae</i> sp.	4	20	60
<i>T. obliquus</i>	7	5	60
<i>T. obliquus</i>	4	1,25	60
<i>Coelastrella</i> sp.	7	2,5	60
<i>Coelastrella</i> sp.	4	2,5	60
<i>S. bacillaris</i>	7	5	30
<i>S. bacillaris</i>	4	5	30
<i>Porphyridium</i> sp.	7	1,25	60